



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

Escuela Politécnica Superior

Facultad de Biología

Santiago de Compostela e Lugo

## TESIS DE DOCTORADO

**Puesta a punto de protocolos para la transformación  
genética de las variedades de vid ‘Tempranillo’ y  
‘Albariño’ e introducción de los genes *VvFT* y *Vvgai*  
relacionados con la floración temprana.**

Autor

Rubén Saporta Bon

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN AGRARIA Y FORESTAL

Santiago de Compostela

2018





## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Puesta a punto de protocolos para la transformación genética de las variedades de vid ‘Tempranillo’ y ‘Albariño’ e introducción de los genes *VvFT* y *Vvgai* relacionados con la floración temprana.

D./Dña. Rubén Saporta Bon

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Santiago de Compostela, de de 2018*

Fdo. Rubén Saporta Bon







## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Puesta a punto de protocolos para la transformación genética de las variedades de vid 'Tempranillo' y 'Albariño' e introducción de los genes *VvFT* y *Vvga1* relacionados con la floración temprana.

D./Dña. Antonio Segura Iglesias

y

D./Dña. Carmina Gisbert Doménech

INFORMA/N:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. Rubén Saporta Bon, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela,                      de                      de 2018*

Fdo. Antonio Segura  
Iglesias

Fdo. Carmina Gisbert  
Doménech



## Agradecimientos

Ya iba siendo hora de que diera fin a esta tesis doctoral después de tantos años con momentos agrídulces. Este camino ha sido duro y ha acabado bien gracias a una serie de personas que han estado ahí y a las cuales me gustaría agradecerleselo.

En primer lugar quisiera agradecerle a mi directora de tesis Carmina Gisbert Domenech por el apoyo, los consejos, las revisiones y la paciencia con la que me ha ayudado a terminarla, si ella no me hubiera recogido no podría haberla acabado.

A mi tutor y director de tesis Antonio Segura Iglesias, por apoyarme tanto cuando estaba en Santiago como cuando estaba en Valencia.

A mi primer director José Ramón Vidal Juvino con el que empezó este trabajo aunque se bajara del barco.

A mis compañeros de laboratorio en Santiago de Compostela, Laura y Vero, sobre todo a esta última por ser más que el técnico, ser una amiga tanto cuando estaba en Galicia como aún en la distancia.

A los amigos de Santiago, Javi, David, Javi 10, Nati y María cuya amistad y salidas de tapeo me permitió no acordarme tanto de que no estaba en casa.

A mis amigos de Valencia, Coca, Toni, Dani, Llorenç, Mónica y Lola por estar ahí para quedar, jugar y divertirnos con lo que más nos gusta.

A mis compañeros de laboratorio del COMAV, los Andrés, Aurora, Gerardo, Tania y Paco.

A todos los colaboradores, investigadores y compañeros que me han ayudado con los protocolos, estadística, datos, materiales, etc...

A mi padre Miguel A. y mis hermanos, Miguel F. y Vicente que también me han apoyado y animado cuando las cosas han ido mal, cuando me he quedado atascado, y cuando he querido dejarlo. También a los que no están por su inspiración y recuerdos.

A mi nueva familia, mis suegros Jaime y Loren y mi cuñado Jaime, por esos domingos de paella y su ayuda y cariño incondicional.

Y sobre todo a mi querida esposa Lorena. Mi amiga y compañera de vida, a la que tanto amo. Gracias por quererme y soportarme, por acompañarme en este viaje. Por levantarte junto a mí todos los días, apoyarme y empujarme para que avance. Eres el amor de mi vida, te quiero.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación por la beca FPI BES-2010-038474 concedida asociada al proyecto AGL2009-11481.





## **ÍNDICE**



# ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS</b>	1
<b>2. RESUMEN</b>	3
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	11
3.1 La vid	11
3.2 Taxonomía	11
3.3 Características botánicas y origen	11
3.4 Importancia económica	12
3.5 Cultivares de vid: el cultivar ‘Albariño’ y el cultivar ‘Tempranillo’	13
3.5.1 Cultivar ‘Albariño’	13
3.5.2 Cultivar ‘Tempranillo’	14
3.6 Floración en la vid	15
3.6.1 Genes relacionados con la floración en la vid	17
3.6.2 Genes de floración temprana	19
3.6.2.1 Gen <i>VvFT</i> ( <i>V. vinifera FLOWERING LOCUS T</i> )	20
3.6.2.2 Gen <i>Vvgai</i> (versión mutante el gen <i>VvGAI1</i> ) ( <i>V. vinifera GIBBERELLIN INSENSITIVE 1</i> )	20
3.7 Transformación genética: estudio de la función génica y mejora vegetal	22
3.7.1 Transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i>	23
3.7.2 Transformación mediada por biolística	24
3.7.3 Genes marcadores	25
3.7.3.1 Genes marcadores de selección	25
3.7.3.2 Genes informadores o “chivatos”	26
3.8 Cultivo <i>in vitro</i> y regeneración de plantas	27
3.9 Técnicas moleculares para la caracterización de las plantas transgénicas	29
3.10 Trabajos realizados en transformación genética para la mejora de la vid	29
<b>4. OBJETIVOS</b>	35
5.1 Inducción de la embriogenesis	39
5.1.1 Obtención de callos embriogénicos: estudio de la influencia del explante de partida y el medio de cultivo	39
5.1.2 Obtención de líneas embriogénicas y suspensiones celulares: materiales base para la transformación	41
5.2 Puesta a punto de la metodología de transformación	42
5.2.1 Influencia del tipo y tamaño de partícula en la transformación transitoria	43

5.2.2 Comparación de velocidades de agitación del oro en la adherencia a la partícula.....	43
5.2.3 Ajuste de la concentración de antibióticos para la selección de plantas transformadas..	43
5.3 Elaboración de plásmidos y experimentos de transformación para la expresión de los genes <i>VvFT</i> y <i>Vvgai</i> .....	45
5.3.1 Plásmidos pGreen.....	45
5.3.2 Obtención y validación de plásmidos portadores de los genes <i>VvFT</i> y <i>Vvgai</i> a utilizar en los experimentos de transformación.....	46
5.3.2.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i> con los plásmidos pJit60, pSoup, pGreenI 29 y GreenII 179.....	46
5.3.2.2 Clonación de los genes <i>Vvgai</i> y <i>VvFT</i> en el plásmido pJit60 .....	47
5.3.2.3 Inserción del casete del pJit60+ <i>Vvgai</i> y pJit60+ <i>VvFT</i> en los plásmidos pGreen.....	51
5.3.2.4 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con los plásmidos obtenidos.....	53
5.3.3 Transformación mediante biolística de suspensiones celulares para introducir los genes <i>VvFT</i> y <i>Vvgai</i> en los cultivares ‘Albariño’ y ‘Tempranillo’.....	54
5.3.4 Introducción de los genes <i>VvFT</i> y <i>Vvgai</i> mediante transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> .....	55
5.3.5 Caracterización molecular de las plantas regeneradas: inserción y expresión de los transgenes.....	56
5.3.5.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	56
5.3.5.2 Secuenciación de las plantas transformadas con el gen <i>Vvgai</i> .....	57
5.4 Caracterización fenotípica de las plantas transgénicas.....	57
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
6.1 Inducción de la embriogénesis .....	61
6.1.1 Obtención de callos embriogénicos: estudio de la influencia del explante de partida y del medio de cultivo .....	61
6.1.2 Obtención de líneas embriogénicas y suspensiones celulares: material base para la transformación.....	63
6.2. Puesta a punto de la metodología de transformación .....	65
6.2.1 Influencia del tipo y tamaño de partícula en la transformación transitoria .....	65
6.2.2 Comparación de velocidades de agitación del Oro en el <i>coating</i> .....	67
6.2.3 Ajuste de la concentración de antibiótico para la selección de plantas transformadas. ..	68
6.3. Elaboración de plásmidos y experimentos de transformación para la expresión de los genes <i>VvFT</i> y <i>Vvgai</i> .....	72
6.3.1 Obtención y validación de plásmidos portadores de los genes <i>VvFT</i> y <i>Vvgai</i> a utilizar en los experimentos de transformación.....	72



6.3.2 Transformación mediante Biolística de suspensiones celulares para introducir los genes <i>VvFT</i> y <i>Vvgai</i> en los cultivares ‘Albariño y ‘Tempranillo’.....	76
6.3.3 Introducción de los genes <i>VvFT</i> y <i>Vvgai</i> mediante transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> .....	80
6.3.4 Caracterización molecular las plantas regeneradas: inserción y expresión de los transgenes.....	81
6.4 Caracterización fenotípica de las plantas transgénicas.....	84
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>95</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>115</b>





## 1. ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

4-CPPU: N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea

BAP: 6-Benzylaminopurina

dCAPS: Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

DMSO: Dimetilsufóxido

DOP: Denimación de origen protegida

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura

IBA: Ácido indolbúrico.

KOH: Hidróxido de potasio

LB: Medio Lisogenic Broth o Luria Broth.

MS: Medio de cultivo con sales Murashige y Skoog

MSE: Medio Murashige y Skoog para embriogénesis

MS/2CA: Medio Murashige y Skoog a la mitad con carbón activo

MS/2OSRED: Medio Murashige y Skoog Post-Bombardment Reduction of Medium Osmoticum

NaCl: Cloruro de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NOA: Ácido naftoxiacético

NN: Medio de cultivo con sales Nitsch y Nitsch

NNE: Medio Nitsch y Nitsch para embriogénesis

PAGAR: Medio Murashige y Skoog papel agar.

PCV: Packed Cell Volume (volumen de células empaquetadas).

PEM: Proembriogenic mases

PVP: Pirrolidona polivinilo

WP: Medio de cultivo con sales Woody Plant



## 2. RESUMEN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos más extendidos en el mundo con gran importancia económica, la mayor parte del cultivo se dedica a la producción de uva de vinificación y en menor medida a la producción de uva de mesa, zumos y pasas. España es el segundo país europeo en producción de vid, por lo que la importancia económica del sector vitivinícola es sustancial. En nuestro país existen numerosas Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) siendo el cultivar ‘Albariño’ de gran importancia en las DOPs de Galicia y el cultivar ‘Tempranillo’ a nivel nacional.

Las metodologías de transformación genética son de gran interés puesto que ofrecen la posibilidad de modificar plantas tanto para mejorar caracteres agronómicos como para realizar estudios de genómica funcional. En la vid y especies relacionadas (*Vitis* sp.) esta metodología es de especial interés puesto que las variedades que se utilizan no son líneas puras, sino genotipos con alto grado de heterocigosis seleccionados a lo largo de los años por sus cualidades y que se mantienen por reproducción vegetativa. La transformación de vid se realiza principalmente mediante la inducción de callos proembriogénicos y su subsiguiente infección utilizando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (actualmente *Rhizobium radiobacter*) portadoras del gen o genes de interés, pero también mediante biolística, aunque este método suele ser mejor para estudios de expresión transitoria. La regeneración de plantas de vid a partir de las células transformadas es muy dificultosa, lo que implica un problema a solucionar al utilizar esta metodología.

El objetivo de esta tesis es la puesta a punto de protocolos para la transformación de las variedades de vid ‘Tempranillo’ y ‘Albariño’, y la introducción de los genes *VvFT* y *Vvgai*. Estos genes están implicados en la inducción floral y podrían conferir a las plantas una floración temprana y un acortamiento del periodo juvenil, lo que sería de gran interés en la vid debido a que su fase juvenil puede durar varios años. Además, facilitaría la realización de estudios genéticos y programas de mejora. Se ha comprobado que la expresión del gen *Vvgai* da lugar a plantas enanas sin modificar el tamaño de la baya y la generación de semillas lo que facilita su manejo.

Para alcanzar el objetivo de este trabajo se han llevado a cabo ensayos para establecer líneas embriogénicas que constituyen el material a transformar; se han elaborado dos construcciones portadoras de los genes *VvFT* y *Vvgai* utilizando plásmidos pGreen y se han estudiado distintos factores que afectan a la transformación mediante biolística (influencia de diferentes tipos y tamaños de partícula, velocidades de agitación de las partículas durante la adherencia del ADN (*coating*) y evaluación del tipo y concentración de los agentes selectivos). Por otra parte, se ha evaluado los antibióticos y las concentraciones más adecuadas para llevar a cabo la selección de las plantas transgénicas. Este paso es limitante en los protocolos de transformación y por lo tanto, llevar a cabo una

selección adecuada es muy importante tanto en si se utiliza la metodología biolística como la mediada por *A. tumefaciens*. Como resultado de los ensayos realizados se ha obtenido expresión transitoria en ensayos de biolística con las variedades ‘Albariño’ y ‘Tempranillo’ y también se han regenerado plantas de estas variedades que han insertado los genes *VvFT* y *Vvgai*. La integración de los genes en las plantas regeneradas ha sido confirmada mediante PCR o por secuenciación. En cuanto al fenotipo en el marco de esta tesis se ha podido observar floración temprana en cultivo *in vitro* en algunas de las plantas que habían integrado el gen *VvFT* y un mayor número de entrenudos cortos en plantas transgénicas (portadoras del gen *Vvgai*) cultivadas en invernadero.



## ABSTRACT

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is an economical important crop cultivated worldwide, most of their production is destined to vinification and, to a lesser extent, to produce table grapes, juice and raisins. Spain is the second grapevine producer in the EU, with a substantial influence of the wine sector in the economy. There are many Protected Designation of Origin areas in Spain, the cultivar ‘Tempranillo’ is one of the most used whereas the grapevine cultivar ‘Albariño’ is of great importance in Galicia.

Genetic modification methodologies offer the possibility to improve agronomic traits in plants and carry out studies on Functional Genomics. For grapevine and related species (*Vitis* sp.) these methodologies have a particular relevance given that the varieties that are being used are not pure lines, but genotypes with a high degree of heterozygosity selected through the years for their qualities and maintained by vegetative propagation. Grapevine modification is conducted by embryonic callus induction following infection with strains of *Agrobacterium tumefaciens* (currently *Rhizobium radiobacter*) that carry the gene or genes of interest. Another methodology that can be applied is biolistics, although it is better in transient expression studies. Regeneration of grapevine from modified cells is very difficult, therefore it is needed to develop adequate protocols to improve it.

The objective of this thesis is implementing protocols for the modification by genetic transformation of the varieties ‘Tempranillo’ and ‘Albariño’ and the introduction of the genes *VvFT* and *Vvgai*. These genes are involved in floral induction and can shorten the juvenile phase, which would be of great interest in the case of grapevines because juvenile phase can last several years. It would also facilitate carrying out genetic studies and breeding programs. The expression of the gene *Vvgai* has been proven to produce dwarf plants without altering the size of the fruits or seed generation, which makes them easier to work with.

To reach the objectives of this thesis different assays have been conducted to establish embryogenic lines that provide the material to be modified; to obtain plasmids carrying the genes *VvFT* and *Vvgai*; and to evaluate different factors that can affect transformation efficiencies when the biolistic methodology is used. Moreover, the kind of antibiotics and the most suitable concentrations for the selection of the transgenic plants have been evaluated. This step is limiting in transformation protocols. Therefore, carrying out a proper selection is very important whether using biolistics or via *A. tumefaciens*. As a result, transient expression has been obtained when biolistics was used in both varieties ‘Albariño’ and ‘Tempranillo’. Also, the genes *VvFT* and *Vvgai* have been introduced in both varieties. The integration of the genes has been confirmed through PCR or sequencing from regenerated plants. Regarding the phenotype, in this thesis it has been observed early flowering in some *in vitro* plants that had integrated the *VvFT* gene and, a plants with a higher number of short internodes was observed in transgenics carrying the *Vvgai* gene which are growing under greenhouse conditions.

## RESUMO

A vide (*Vitis vinifera* L.), é un dos cultivos máis extendidos no mundo con gran importancia económica. A maior parte do cultivo dedícase á produción de uva de vinificación e, en menor medida, á produción de uva de mesa, zumos e pasas. España é o segundo país europeo en produción de vide, polo que a importancia económica do sector vitivinícola é sustancial. No noso país existen numerosas Denominacións de Orixe Protexidas (DOP) sendo o cultivar ‘Albariño’ de gran importancia nas DOPs de Galicia e o cultivar ‘Tempranillo’ a nivel nacional.

As metodoloxías de transformación xenética son de gran interese, xa que ofrecen a posibilidade de modificar plantas tanto para mellorar caracteres agronómicos como para realizar estudos de xenómica funcional. Na vide e especies relacionadas (*Vitis* sp.) esta metodoloxía é de especial interese xa que as variedades que se empregan non son liñas puras, senón xenotipos cun alto grado de heterocigose seleccionados ao longo dos anos polas súas cualidades e que se manteñen por reprodución vexetativa. A transformación da vide realízase principalmente mediante a inducción de callos proembrioxénicos e a súa subseguinte infección utilizando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (actualmente *Rhizobium radiobacter*) portadoras do xene ou xenes de interese, pero tamén mediante biolística, aínda que este método soe ser mellor para estudos de expresión transitoria. A rexeneración de plantas de vide a partir das células transformadas é moi dificultosa, o que implica un problema a solucionar cando se emprega esta metodoloxía.

O obxectivo desta tese é a posta a punto de protocolos para a transformación das variedades de vide ‘Tempranillo’ e ‘Albariño’, e a introducción dos xenes *VvFT* e *Vvgai*. Estes xenes están implicados na inducción floral e poderían conferir ás plantas unha floración temprana e un acurtamento do período xuvenil, o que sería de gran interese na vide debido a que a súa fase xuvenil pode durar varios anos. Ademais, facilitaría a realización de estudos xenéticos e programas de mellora. Comprobouse que a expresión do xene *Vvgai* dá lugar a plantas ananas sen modificar o tamaño da baga e a xeración de sementes o que facilita o seu manexo.

Para alcanzar o obxectivo deste traballo leváronse a cabo ensaios para establecer liñas embrioxénicas que constitúen o material a transformar; elaboráronse dúas construcións portadoras dos xenes *VvFT* e *Vvgai* utilizando plásmidos pGreen e estudáronse distintos factores que afectan á transformación mediante biolística (influenza de diferentes tipos e tamaños de partícula, velocidades de axitación das partículas durante a adherencia do ADN a partículas (*coating*) e avaliación do tipo e concentración dos axentes selectivos). Por outra parte, avaliáronse os antibióticos e as concentracións máis adecuadas para levar a cabo a selección das plantas transxénicas. Este paso é limitante nos protocolos de transformación. Polo tanto, levar a cabo unha selección adecuada é moi importante tanto como si se utiliza a metodoloxía biolística como a mediada por *A. tumefaciens*. Como resultado dos ensaios realizados obtívose expresión transitoria en ensaios de biolística coas



variedades ‘Albariño’ e ‘Tempranillo’ e tamén se rexeneraron plantas que insertaron os xenes *VvFT* e *Vvgai*, nestas variedades. A integración dos xenes nas plantas rexeneradas foi confirmada mediante PCR ou por secuenciación. En canto ó fenotipo no marco desta tese, puidose observar floración temprana en cultivo in vitro nalgunhas das plantas que integraran o xene *VvFT* e un maior número de entrenudos curtos en plantas tranxénicas (portadoras do xene *Vvgai*) cultivadas en invernadoiro.







## **INTRODUCCIÓN**



### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 LA VID

#### 3.2 TAXONOMÍA

La vid (*Vitis sp.*) es una planta perteneciente al Reino *Plantae*, *Phylum Angiospermae* (*Magnoliophyta*), Clase *Dicotyledoneae* (*Magnoliopsida*), Familia *Vitaceae*, Género *Vitis*. La mayoría de variedades utilizadas para vinificación o consumo fresco pertenecen a la especie *vinifera* subespecie *vinifera* (Keller, 2010).

#### 3.3 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y ORIGEN

La vid (*Vitis vinifera* L.) (Figura 1) es una planta leñosa, trepadora, que puede alcanzar hasta 30 metros de longitud. Su tronco presenta una corteza gruesa y áspera y crece retorcidamente. Las ramas jóvenes denominadas pámpanos o sarmientos son flexibles y están engrosadas en nudos. Alternando sobre ellas se disponen las hojas que son palmadas, con la lámina profundamente hendida en lóbulos gruesamente dentados. Los zarcillos están opuestos a las hojas y se engrosan y lignifican cuando encuentran soporte. Las flores, que se presentan en inflorescencias, son pequeñas, hermafroditas o unisexuales, pentámeras de color verdoso, y se disponen en panículas colgantes y opuestas a las hojas. La corola está formada por cinco pétalos de color verdoso, dejando al descubierto cinco estambres. El ovario es súpero, con dos cavidades, de estilo muy corto y estigma discoidal, y está rodeado en la base por un disco nectarífero pentalobulado. El fruto es una baya globosa o elipsoidal, con entre 2 y 4 semillas. El género *Vitis* se cultiva en prácticamente todas las regiones de la zona templada, creciendo silvestre entre los 35° de latitud sur y los 50° de latitud norte y de forma cultivada entre los 38° sur y 53° norte.



Figura 1: Dibujo de las partes de la vid. Köhler's Medizinal-Pflanzen (1887-1897)

La especie *V. vinifera*, pertenece al grupo Euroasiático del género *Vitis*, que surgió al comienzo de la Era Terciaria y los primeros fósiles son del Paleoceno. Es nativa del oeste de Asia y Europa, y estuvo temporalmente confinada entre el sur del Cáucaso entre el Mar Negro y el Mar Caspio, y la región Mediterránea. La viticultura se inició en el reino de Mesopotamia hace 5000 años, entre los ríos Tigris y Éufrates. De allí se extendió por el Mediterráneo en donde fue adoptada por los griegos (Martínez *et al.* 1999). Posteriormente, los romanos absorbieron estos conocimientos y la extendieron por Europa y por todos los rincones del Imperio (Hidalgo, 1993). En la edad media, el vino se convirtió en el símbolo cristiano, representando a la sangre de Cristo. La viticultura era exclusiva de los señores feudales y de los monasterios. En el siglo XVI, la viticultura fue exportada a América en los primeros viajes de Colón hacia México y Perú. Un siglo más tarde el cultivo fue introducido en Sudáfrica. En el XIX se estableció en Australia (Beeston, 2001).

### 3.4 IMPORTANCIA ECONÓMICA

La vid es uno de los cultivos de fruta más extendido en el mundo, y se cultiva tanto para la fabricación del vino como para el consumo de fruta fresca y en menor medida para la producción de pasas, zumos y brandy, siendo el primer uso para el que más hectáreas hay destinadas.

Actualmente hay aproximadamente 7 millones y medio de hectáreas cultivadas de vid en todo el mundo, casi 3 en Europa, de las cuales 1 millón de ellas están en España, que junto con Italia y Francia son los países en donde hay una mayor producción. Su cultivo representó un valor internacional de 44 mil millones de dólares en 2013 (FAOStat, 2013a). La producción global de vino en 2014 ha sido de 29 millones de toneladas (Figura 2) (FAOStat, 2014b), la mayoría producida a partir de uva de vino europea (Dhingra *et al.* 2012). Por tanto, no es de extrañar el hecho de que *V. vinifera* sea uno de los cultivos frutales más importantes en el mundo (Mukherjee *et al.*, 2010). En cuanto a la producción, Europa produce el 60,7% de la producción mundial de uva (siendo España el segundo productor) seguida de Asia (7,2%), América (22,5%), África (4,4%) y Oceanía (5,2%) (FAOStat, 2014c).

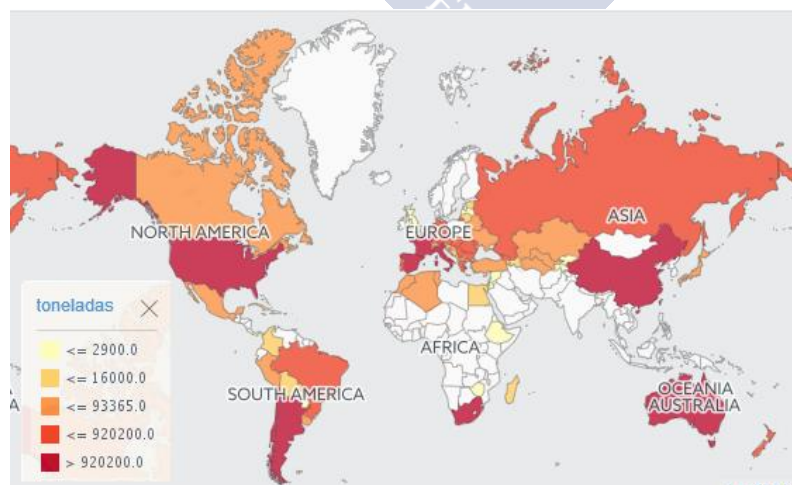


Figura 2: Producción en toneladas de uva de las diferentes regiones del mundo desde 2013 al 2014 según FAOStat.

En España, la superficie plantada de viñedo según datos del Registro Vitícola de cada comunidad autónoma a 31 de julio de 2013 asciende a 957.573 hectáreas. Del total de la superficie nacional, el 85% corresponde a zonas potencialmente aptas para la elaboración de vinos Denominación Origen Protegida y el 8% Indicación Geográfica Protegida (<http://www.magrama.gob.es>). En la comunidad autónoma gallega, hay aproximadamente 25 mil hectáreas cultivadas, con una producción de 125 mil toneladas de uva al año (<http://www.mediatoruralemar.xunta.es>), de las cuales la variedad blanca ‘Albariño’ y tinta ‘Tempranillo’ son de gran importancia. Actualmente, en Galicia existen 5 denominaciones de origen protegidas, que son: D.O. Rías Baixas, D.O. Ribeiro, D.O. Ribeira Sacra, D.O. Valdeorras y D.O. Monterrei (Figura 3).

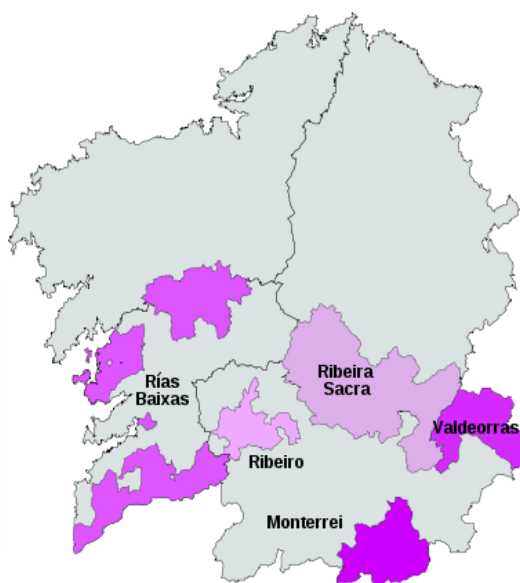


Figura 3: Mapa de las denominaciones de origen gallegas. <http://www.magrama.gob.es>

### 3.5 CULTIVARES DE VID: EL CULTIVAR ‘ALBARIÑO’ Y EL CULTIVAR ‘TEMPRANILLO’

En el marco de esta tesis, se van a utilizar dos cultivares de vid de gran importancia económica en España: una uva blanca, el ‘Albariño’ y una uva tinta, el ‘Tempranillo’.

#### 3.5.1 CULTIVAR ‘ALBARIÑO’.

A día de hoy todavía no está claro el origen de la variedad ‘Albariño’ que puede considerarse la variedad reina de la D.O. Rías Baixas. Hay quien defiende que se trata de una variedad autóctona de las Rías Baixas, pero también hay otra teoría que dice que dicha variedad fue introducida en el siglo XII por los monjes franceses de la Abadía de Clunny, de peregrinación a Santiago, en el Monasterio de Armenteira (Pontevedra). La cepa se aclimató rápidamente al clima gallego y de allí se extendió su cultivo al resto de Galicia y al norte de Portugal (Vila Fariña, 2010).

La uva ‘Albariño’ (Figura 4) es una variedad de brotación temprana y de maduración tardía. Es decir, una variedad con un largo ciclo vegetativo. En cuanto a su descripción morfológica, la extremidad del pámpano joven es algodonosa, con pigmentación rojiza; la hoja joven presenta un color bronceado y el envés bastante algodonoso y la hoja adulta tiene un tamaño pequeño, cuneiforme u orbicular, con senos

laterales muy poco profundos, hoja entera de haz verde brillante y con el envés ligeramente algodónoso. El racimo es de tamaño pequeño, con compacidad media y forma doble con alas o cónico corto. La baya es de tamaño mediano, forma esférica y color verde amarillento (Cabello *et al.* 2011).



Figura 4: Imagen del racimo y hoja de la variedad 'Albariño' ( Imagen de <http://newsomfamilyfarms.com/grape-varieties/>)

Los vinos monovarietales del tipo 'Albariño' presentan un color amarillo-pajizo, brillante, con irisaciones doradas y verdes. En nariz poseen aromas florales y frutales finos y distinguidos, que impresionan agradablemente, de intensidad media y potente duración medio-larga. En boca son frescos y suaves, con suficiente cuerpo y grado alcohólico, acidez equilibrada, armoniosos y de amplios matices. Su retrogusto es placentero, elegante y completo (Denominación de Origen Rias Baixas, 2015).

### 3.5.2 CULTIVAR 'TEMPRANILLO'

El cultivar 'Tempranillo' (Figura 5) es una variedad de uva tinta originaria de España. Se considera autóctona de La Rioja y se extendió siguiendo la ruta de los monasterios cistercienses por toda España. Su nombre proviene de la palabra temprano, que indica el hecho de que la uva madura unas semanas antes que la mayor parte de las variedades de uva tinta españolas. Esta variedad crece mejor en altitudes relativamente altas, pero puede tolerar climas más templados.

Esta uva podría haber surgido por una hibridación espontánea entre las variedades, Albillo mayor y Benedicto producida en el valle del Ebro (Ibáñez *et al.* 2012). Estos autores identificaron a las variedades parentales mediante el análisis de SNP y microsatélites.





Figura 5: Racimo de uva de la variedad 'Tempranillo'. (Imagen de [www.riberadelduero.com](http://www.riberadelduero.com))

En cuanto a la descripción morfológica, presenta la extremidad del pámpano joven muy algodonosa, con pigmentación rojiza. Tiene una hoja joven de color rojizo y envés muy algodonoso. La hoja adulta es de tamaño grande, pentagonal, con senos laterales muy profundos, heptalobuladas, con haz verde oscuro y con un envés algodonoso y fuertemente arañoso. Posee un racimo de tamaño mediano, con compacidad muy alta y forma cilíndrica con alas. La baya es de tamaño mediano, con forma esférica, piel gruesa y color azul negro (Cabello *et al.* 2011).

Genera unos vinos color rojo rubí, con aromas de bayas, ciruelo, tabaco, vainilla, cuero y hierba. Posee un paladar franco. Se suele utilizar en mezclas, generalmente ocupando un gran porcentaje de esa mezcla. Menos frecuentemente se embotella como vino varietal.

### 3.6 FLORACIÓN EN LA VID

Las variedades de vid cultivadas tienen, generalmente, flores perfectas, es decir, hermafroditas (contienen tanto el ovario como las anteras en una misma flor) (Figura 6). Son flores verdes, inconspicuas y pequeñas. Están compuestas por un receptáculo que lleva 5 sépalos, 5 pétalos, 5 estambres (bilobados) y un pistilo (compuesto por un ovario súpero con estilo corto y un estigma). Las flores se presentan en inflorescencias opositifolias, las cuales presentan entre uno y tres racimos por pámpano fértil. Los racimos presentan un número de flores variables que puede oscilar entre 50 a 100 flores para los pequeños y de 1000 a 1500 en los grandes.



Figura 6: Imagen de dos flores de *V. vinifera* (abierta y cerrada). Imagen propia.

La vid, como planta leñosa que es, tiene una fase juvenil o vegetativa que dura varios años antes de que pueda alcanzar su fase reproductiva. Esta fase puede durar entre 2 y 5 años (Figura 7), y es necesaria para que la vid pueda disponer de amplios recursos para la producción de la uva. La formación de la flor se puede dividir en 3 procesos: iniciación o inducción de la inflorescencia, la iniciación de la flor y la diferenciación floral. El primer proceso conlleva la formación de meristemos laterales como primordios no determinados o no comprometidos (May 2004). Este primordio se puede diferenciar en una estructura extra-axilar que depende del ambiente en el cual el primordio se ha formado, así pues, si se ha formado dentro de las yemas latentes, puede desarrollarse como un primordio de inflorescencia. Si se ha formado en brotes de rápido crecimiento, generalmente se diferencia en zarcillos. En el primer caso, antes de que las yemas entren en dormancia durante el invierno, se forma en las yemas latentes un principio de inflorescencia inmadura, que aguantará las condiciones del invierno.

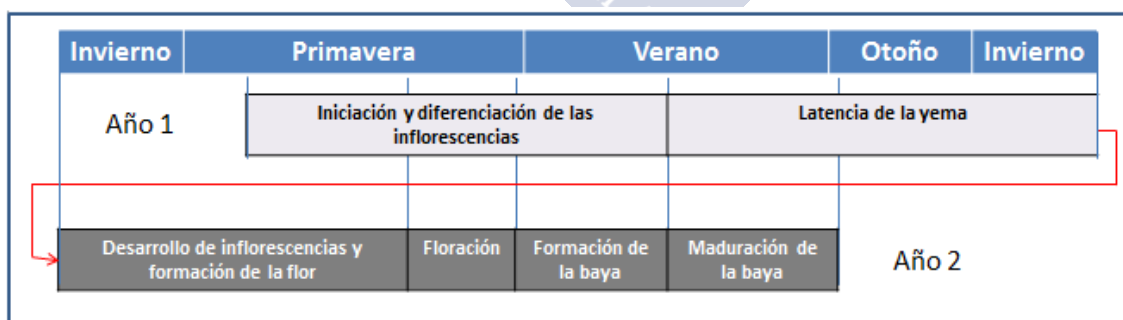


Figura 7: Esquema idealizado del desarrollo del ciclo reproductor de la vid durante 2 años (adaptado de Carmona *et al.* 2008)

En la siguiente primavera, cuando las yemas se reactivan y empiezan a crecer, esta inflorescencia inmadura continua su desarrollo, generando más meristemos laterales, que a su vez generan 3 o 4 meristemos florales, con lo que se ramifica y generan las flores. Este proceso se denomina iniciación de la flor y ocurre simultáneamente en todas las partes de

la inflorescencia culminando con la formación de un cáliz para cada flor (Carmona *et al.* 2008). El posterior desarrollo de los órganos florales o diferenciación floral ocurre aproximadamente hacia las 5 semanas del inicio del despertar de las yemas. La corola (pétalos fusionados que forman una estructura protectora de los órganos reproductores) y estambres aparecen sucesivamente y opuestos. El pistilo cubierto por la corola no se desarrolla hasta que las flores se ven separadas dentro de la inflorescencia. Este pistilo procede de entre 2 a 5 carpelos fusionados para formar un anillo meristemático que forma el gineceo. Más tarde, el gineceo forma dos unidades, separadas por un septo, lo cual genera dos lóbulos, en donde se forman 2 óvulos. Aproximadamente 2 semanas después de que los óvulos se hayan formado, la antesis marca el principio de la floración y cae la corola protectora exponiendo los órganos masculinos y femeninos (Keller, 2010).

Posteriormente, las anteras maduran y se abren, liberando el polen que se recoge en el pistilo. Generalmente, las variedades cultivadas de la vid, se autofecundan y el cruce ocurre ocasionalmente debido al viento, que transporta el polen. Tras la polinización se produce el fruto.

### 3.6.1 GENES RELACIONADOS CON LA FLORACIÓN EN LA VID

La formación de flores ocurre por una serie de pasos secuenciales bajo un control estrictamente genético (Meneghetti *et al.* 2006). Según Vasconcelos *et al.* (2009) en este proceso se podría implicar a tres grupos de genes: Genes de inducción floral, genes de identidad meristemática floral y genes de identidad de los órganos florales. Muchos de estos genes son ortólogos en *Arabidopsis thaliana* y en *V. vinifera* (Figura 8). Sin embargo, también existen otros factores internos (ie. como los reguladores de crecimiento) o externos, como las condiciones ambientales, que van a influir en el desarrollo floral.

Genes de inducción floral: En la vid, no hay una clara evidencia de la clásica ruta de iniciación floral, como las vías del fotoperiodo o de la vernalización descritas en *Arabidopsis* (Carmona *et al.* 2008). La mayoría de la investigación está centrada en los genes integradores floral y los genes de identidad meristemática floral (Boss *et al.* 2006; Calonje *et al.* 2004; Carmona *et al.* 2002; Joly *et al.* 2004; Sreekantan and Thomas 2006; Vasconcelos *et al.* 2009). Tres miembros de la subfamilia de genes MADS box de *SUPPRESSOR OF CONSTANS1/AGAMOUS LIKE 20 (SOC1/AGL20)* han sido identificados en la vid (Carmona *et al.* 2008). El patrón de expresión del único gen caracterizado de esta subfamilia, el *MADS8* (Sreekantan and Thomas 2006), es consistente con el rol de iniciación floral, siendo muy alto durante las fases tempranas del desarrollo de la inflorescencia. La expresión decae durante el desarrollo floral y no se encuentra en la flor madura ni en el fruto.

También ha sido caracterizado el gen *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Boss *et al.* 2006; Carmona *et al.* 2007a). El ortólogo a *FT*, el *VvFT* está asociado con la inducción floral estacional en yemas latentes y con el desarrollo de la inflorescencia (Díaz-Riquelme *et al.* 2012; Vergara *et al.* 2016).

La familia de genes *TFL1* se expresan en yemas latentes y durante las fases iniciales del desarrollo de la inflorescencia, pero no durante el desarrollo en la estación de floración (Carmona *et al.* 2007a).

La sobreexpresión del gen *VvTFL1* provoca un atraso en la floración y la iniciación de los meristemos florales (Crane *et al.* 2012), lo que apoya la idea de que tiene un papel en el mantenimiento de la indeterminación meristemática.

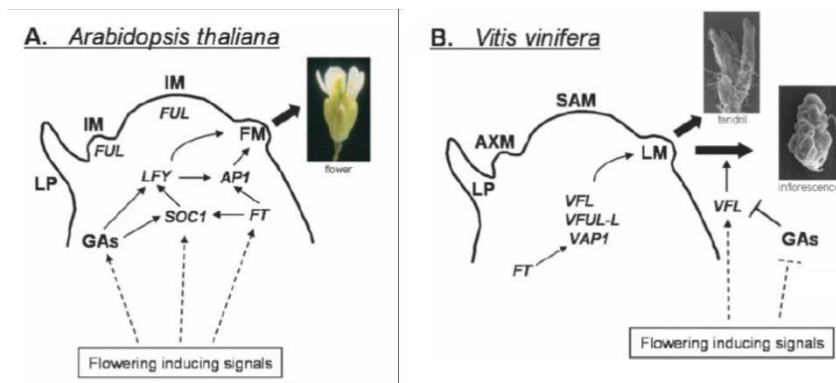


Figura 8: Comparativa entre las rutas de señalización que controlan la inducción floral en *A. thaliana* (A) y *V. vinifera* (B) (Carmona *et al.* 2007b)

**Genes de la identidad meristemática floral:** Se han caracterizado los genes ortólogos de *LEAFY* (*LFY*) y *APETALA1* (*AP1*) en la vid. Análisis *in situ* de los patrones de expresión de *VFL* (ortólogo de *LFY*) han localizado la expresión antes del compromiso del desarrollo floral (Boss *et al.* 2006; Carmona *et al.* 2002; Joly *et al.* 2004; Díaz-Riquelme *et al.* 2012). El patrón de expresión está muy reprimido si el primordio se compromete a la formación de un zarcillo y es altamente inducido si el primordio se compromete a flor. La expresión de *VFL* tiene un pico en los meristemos florales de yemas que florecen durante la primavera. También se expresa en pétalos y estambres, decayendo a medida que se desarrollan estos órganos.

El homólogo de *Arabidopsis AP1* ha sido identificado en la vid (*VAP1*) (Calonje *et al.* 2004). Este gen se expresa muy pronto durante el compromiso de los meristemos laterales. El patrón de expresión de *VAP1* sugiere que puede tener un papel en la transición floral y en el desarrollo floral. Esta expresión no se ha encontrado en órganos vegetativos como las hojas o las raíces. También regula el desarrollo de los zarcillos, los cuales evolucionaron desde las inflorescencias (Carmona *et al.* 2008).

**Genes de identidad de los órganos florales:** El desarrollo e identidad de los órganos florales está controlado por una compleja red de regulación genética. El modelo de floración es el conocido como A, B, C, D y E (Kriek 2006). Se han encontrado genes con función B en vid, que son el *VvMADS9/VvPI*, el *VvAP3* y el *VvTM6* (homólogos de *PISTILATA/PI*, *Tomato MADS-box gene 6/TM6* y *APETALLA3/AP3*, respectivamente) (Sreekantan *et al.* 2006; Poupin *et al.* 2007). Los tres genes se expresan en pétalos y estambres, pero *VvTM6* también lo hace en carpelos (Poupin *et al.* 2007). Como gen C, se han encontrado una serie de genes de la subfamilia AG (*AGAMOUS*), y entre ellos, el *VvMADS1* que se expresa en las primeras espirales de la flor y durante el desarrollo del fruto. Además su sobreexpresión genera sépalos alterados (Boss *et al.* 2003). Otro gen de la familia, el *VvMADS5* se expresa en carpelos maduros, desarrollo de semillas y en frutos (Boss y Thomas, 2002). Este gen es ortólogo de *STK/AGL11* (*SEED STICK*). Otros genes con función E han sido caracterizados recientemente, como son *VvMADS2* y 4, que son similares a *SEPALLATA1* y 2 (*SEPI/2*). Estos genes se expresan durante el desarrollo temprano de la inflorescencia y hasta la antesis (Boss y Thomas, 2002). *VvMADS4* se expresa también durante el desarrollo de la baya. *VvMADS3* (similar a *AGL6*), participa en el desarrollo de las flores y los órganos vegetativos (Alvarez-Buylla *et al.* 2000).

En la vid, la formación de las inflorescencias está regulada a dos niveles, la formación y la diferenciación del primordio. Las giberelinas y las citoquininas son los principales reguladores de la floración. Las giberelinas son necesarias para la formación de



los ejes de la inflorescencia y para su crecimiento. En un estado temprano, las giberelinas son promotoras de la floración porque la formación del primordio depende de ellas. Posteriormente, debido a que promueven el crecimiento vegetativo, las giberelinas actúan como represores de la floración, ya que provocan la diferenciación del primordio en zarcillo. La aplicación de clormecuat favorece la formación de inflorescencias, inhibiendo a las giberelinas y/o favoreciendo la formación de citoquininas en la vid (Mullins *et al.* 1992). Un mutante enano de vid derivado de la capa meristemática L1 del cultivar Pinot Meunier produce inflorescencias a lo largo de la longitud del tallo donde los zarcillos se forman normalmente (Boss y Thomas 2000). El gen mutado asociado con este fenotipo es un homólogo del gen de *Arabidopsis* *GA INSENSITIVE* (*GAI*). La conversión de zarcillos en inflorescencias en el mutante demuestra que el zarcillo de vid es una inflorescencia modificada inhibida de completar el desarrollo floral por GA (Boss y Thomas 2000; Chaïb *et al.* 2010).

Las citoquininas están implicadas en muchos aspectos de la reproducción de la vid. La formación de la flor es un proceso controlado por las citoquininas (Mullins *et al.* 1992). Estas parece que regulan positivamente el desarrollo de inflorescencias desde los meristemas laterales (Crane *et al.* 2012). Cuando a un primordio de zarcillo se le aplican citoquininas, se desarrolla en inflorescencia o en estructuras parecidas a inflorescencias (Srinivasan y Mullins 1978).

Los factores ambientales que promueven la floración en vid no corresponden con los factores típicos en plantas herbáceas, como el fotoperiodo o la vernalización (Carmona *et al.* 2008) ya que estos factores son muy relevantes para la inducción floral. Sin embargo, tiempos cortos de exposición a alta temperatura y alta intensidad lumínica sí han mostrado que promueven la floración en la vid (Mullins *et al.* 1992). Una combinación de temperatura cálida, suficiente iluminación y la ausencia de estrés es requerida para una óptima iniciación (Dunn and Martin 2000; Petrie and Clingeleffer 2005). Se cree que los factores ambientales ejercen su influencia en la floración modificando la composición química interna de la planta, particularmente el equilibrio de las hormonas endógenas y también a través de su impacto en la fotosíntesis de la vid Vasconcelos *et al.* 2009).

La utilización de estos genes y otros relacionados con los reguladores de crecimiento (giberelinas y citoquininas) en conjunción con las técnicas moleculares de la transformación genética, podrían permitir conseguir una serie de plantas con un tiempo, tipo o forma de floración teóricamente personalizables.

### 3.6.2 GENES DE FLORACIÓN TEMPRANA

En vid se han identificado los genes de floración temprana, como el *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) (Bradley *et al.* 1996), *LFY* (*FLORAL MERISTEM IDENTITY GENES LEAFY*) (Weigel 1992), *API* (*APETALA1*) (Mandel *et al.* 1992) o *GAI* (*GIBBERELIN INSENSITIVE*) (Koorneef *et al.* 1985). Estos son aquellos que se piensa que, en sobreexpresión, producen un adelanto de la floración debido a que regulan diferentes fases de esta. Este tipo de genes se han descrito tanto en *Arabidopsis* y en otras plantas. Los homólogos de *Arabidopsis* en vid son el *VvFT* (Carmona *et al.* 2007b; Díaz-Riquelme *et al.* 2012; Vergara *et al.* 2016), *VFL* (Carmona *et al.* 2002), *VAPI* (Calonje *et al.* 2004), *Vvgai* (Boss y Thomas 2002; Chaïb *et al.* 2010), entre otros.

### 3.6.2.1 GEN *VvFT* (*V. VINIFERA FLOWERING LOCUS T*)

El gen *FT* codifica una proteína que comparte una estructura similar a las phosphatidylethanolamine-binding proteins (PEBPs). Esta similitud hace pensar que tendrá un papel de regulación en cascadas de señalización, controlando diversos procesos como hacen las PEBPs (Carmona *et al.* 2007a).

En *Arabidopsis*, *FT* promueve la floración activando directamente al gen *APETALA1* (*API*) en el meristemo apical del tallo (Figura 8). Este efecto es contrario al producido por el gen *TFL1* que controla la duración de la fase vegetativa y atrasa la transición floral. La pérdida de función de *FT* provoca un atraso en la floración, mientras que la sobreexpresión provoca en *Arabidopsis* a una floración precoz independientemente del fotoperiodo (Yoo *et al.* 2005).

*FT* está regulado por la vía de la vernalización y del fotoperiodo. Los estímulos medioambientales que inducen la floración en la vid son una exposición a corto término a altas temperaturas y una intensidad de luz alta (Mullins *et al.* 1992).

Se ha identificado en vid al gen *VvFT* como ortólogo de *FT* en *Arabidopsis*, ya que muestra una gran región conservada de todos los residuos de aminoácidos y regiones características de esta subfamilia. Además, el patrón de expresión está asociado a la inducción floral estacional y el desarrollo de inflorescencias, flores y frutos. Por último, la sobreexpresión del gen *VvFT* provoca efectos similares a la de *FT* (Carmona *et al.* 2007b).

*VvFT* juega un papel clave en la regulación transcripcional de genes del ciclo celular, dando así, más apoyo al modelo para el control fotoperiódico del crecimiento estacional en árboles (Vergara *et al.* 2016). *VvFT* se sobreexpresa durante la inducción de la floración, disminuye durante la latencia del brote y aumenta de nuevo durante la segunda temporada de crecimiento, y probablemente está asociado con los eventos de diferenciación de los meristemos florales y de los órganos de las flores (Díaz-Riquelme *et al.* 2012).

### 3.6.2.2 GEN *VvGAI* (VERSIÓN MUTANTE EL GEN *VvGAIL*) (*V. VINIFERA GIBBERELLIN INSENSITIVE 1*).

Una quimera producida por una mutación simple (mutación somática) en el gen de la vid *VvGAIL* (gen de insensibilidad a giberelinas, llamado desde ahora *Vvgai*) es la responsable del fenotipo enano y floración precoz de un mutante L1 de la variedad ‘Pinot Meunier’ (Figura 9). Este gen mutado se expresa de manera semi-dominante (Boss y Thomas, 2002; Chaïb *et al.* 2010).

Las giberelinas tienen un papel fundamental en la modulación de esta diferenciación ya que inhiben el desarrollo de inflorescencias, reprimiendo directa o indirectamente a la expresión del gen *VFL*, y promueven el desarrollo de zarcillos. De hecho, mutantes de vid insensibles a giberelinas muestran una transformación completa de los zarcillos en inflorescencias (Boss y Thomas, 2002).



Figura 9: Planta de vid enana (mutante L1 de Pinot Meunier). Imagen propia.

El meristemo apical del tallo de la vid está diferenciado en 2 capas, la L1 y la L2. Con estas capas se obtuvieron plantas regeneradas por embriogénesis somática y se observó que las plantas de la L2 no se diferenciaban del Pinot Meunier, mientras que las de la capa L1 eran enanas (Figura 9). Además, al crecerlas en condiciones de inducción floral (alta temperatura y alta cantidad de luz), las L1 produjeron inflorescencias, mientras que las de la L2 produjeron zarcillos (Chaïb *et al.* 2010).

Las plantas L1 y L2 se diferencian en una mutación en el dominio DELLA. Este dominio está conservado y es único a todos los genes de respuesta a GAs que codifican proteínas reguladoras de la familia GRAS (por *GAI*, *RGA* y *SCR*). Está postulado que esas proteínas modificadas ya no interactúan con la señal de GAs ya que debido a una mutación puntual resulta en una delección o interrupción en la región DELLA de la proteína y generan el fenotipo enano. Esta mutación puntual convierte un residuo de leucina en histidina.

La aplicación de GAs e inhibidores de la síntesis de GAs (paclobutrazol y cloromequat), modificaron el desarrollo de las inflorescencias y los zarcillos, así que se concluyó que las plantas L1 tienen una respuesta alterada a las GAs y estas están asociadas con un gen mutado similar al gen *GAI* de *Arabidopsis* (un regulador negativo de la respuesta a GAs). Debido a que las plantas L1 no responden cuando se aplican GAs externas y además acumulan en las hojas más GAs que las L2 (cuatro veces más  $GA_1$  y doce veces más  $GA_4$ ) y la mutación es semidominante, se supuso que este y el gen *gai* de *Arabidopsis* eran similares. Más tarde, mediante la amplificación de secuencias de *GAI* por PCR se observó que este gen y el *Vvgai* eran idénticos en un 72% de su secuencia (Boss y Thomas, 2002).

### 3.7 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA: ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA Y MEJORA VEGETAL.

La ingeniería genética se ha descrito como una herramienta muy importante para la mejora y la investigación de las plantas. La transformación genética ofrece la posibilidad de modificar genéticamente a las plantas para poder mejorar o cambiar caracteres agronómicos sin que se altere la identidad varietal gracias a la tecnología del ADN recombinante, como por ejemplo la transferencia de resistencias a enfermedades o herbicidas a cultivos establecidos. La utilización de la mejora genética tradicional supone años de cruzamientos y selección hasta incorporar la característica deseada manteniendo las características iniciales de la planta a mejorar. En el caso de la vid cuyas variedades son altamente heterocigotas esta vía es todavía más difícil. La transformación genética también puede utilizarse para realizar estudios de genómica funcional y describir las funciones e interacciones entre genes (Christou y Klee, 2004; Hellens *et al.* 2005; Lee y Yang 2006; Matthew, 2004), en plantas modelo como *A. thaliana* (Grotewold, 2003), *Nicotiana tabacum* (Liu *et al.* 2015) en *V. vinifera* (Martínez-Zapater *et al.* 2010), etc. Por ejemplo con el silenciamiento génico (ARNi) para disminuir la expresión (Small, 2007) o la sobreexpresión (Prelich, 2012).

En primer lugar, la vid se consideró recalcitrante a la transformación genética, pues uno de sus problemas es la regeneración de las plantas a partir de los tejidos utilizados para esta transformación (Mullins *et al.* 1990; Nakano *et al.* 1994) y la diferente respuesta a la transformación dependiendo de la metodología y del genotipo (Kikkert *et al.* 2001) además de la sensibilidad a los antibióticos de selección (Colby *et al.* 1991). La regeneración en la planta de la vid tras la transformación y selección por antibióticos suele ser de entre un 10% y un 30% del total del material transformado y la eficiencia de la transformación, que varía según el genotipo, baja a un 1% aunque se ha descrito algún porcentaje mayor 33% (Torregrosa *et al.* 2015)

Pero a pesar de estos problemas, que siguen siendo importantes, se ha conseguido producir variedades resistentes a enfermedades fúngicas, víricas y bacterianas como el mildiu (Bouquet *et al.* 2000), el GFLV (grapevine fanleaf virus) (Mauro *et al.* 2000) o la agalla en corona (Krastanova, 2010). También se han transformado con éxito distintas especies del género *Vitis* (*V. vinifera*, *V. rupestris*, *V. riparia*), y algunos portainjertos (110R, 41B) (Bouquet *et al.* 2008).

Las técnicas de transformación celular de plantas se dividen en directas e indirectas. Las primeras provocan la permeabilidad de la célula al ADN mediante distintas técnicas como la electroporación, con agentes químicos, ultrasonidos, o biobalística. En las indirectas, se utilizan vectores para la introducción del ADN, como la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, virus o liposomas.

Comunmente la transformación genética de la vid se realiza utilizando la infección con *A. tumefaciens* (actualmente *Rhizobium radiobacter*) (Torregrosa *et al.* 2015) o con la técnica biolística (Kikkert *et al.* 2001). En qué se basan estas técnicas y sus principales ventajas e inconvenientes se comentan en los siguientes apartados. El material vegetal más adecuado para la transformación genética de la vid son los callos embriogénicos (embriones somáticos) y las suspensiones celulares embriogénicas. Los callos embriogénicos son conjuntos de células indiferenciadas que tienen la capacidad, con los estímulos adecuados, de convertirse en un embrión. Mientras que las suspensiones celulares son conjuntos de células disgregadas que viven sobre un medio líquido y que provienen de los callos anteriores.



Los callos son más adecuados para la transformación con *Agrobacterium* (Torregrosa *et al.* 2002) y en la transformación por biolística, es más adecuado es la suspensión celular (Kikkert *et al.* 1996), pues permite generar una capa tupida de células que maximiza la superficie a bombardear.

La disponibilidad de genes y las tecnologías emergentes como el sistema CRISPR/Cas para la modificación del genoma (Wang *et al.* 2016) incrementarían los intentos de mejora en la vid.

### 3.7.1 TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR *A. TUMEFACIENS*.

*A. tumefaciens* es una bacteria patógena gram-negativa del suelo que produce la enfermedad de la agalla de la corona (o agalla de cuello) en los lugares de infección (generalmente heridas). A diferencia de otros patógenos, tiene la habilidad (conferida por los genes vir que contiene en el plásmido Ti) de cortar un fragmento definido de su plásmido (T-DNA) e insertarlo en el genoma de la planta. Este T-DNA (que incluye unos bordes de 25 nucleótidos que son las secuencias reconocidas por la maquinaria de transferencia) contiene unos genes que codifican fitohormonas y otros que codifican opinas (tipo de aminoácidos), que son aprovechados únicamente por la bacteria como fuente de nitrógeno y carbono (Figura 10).

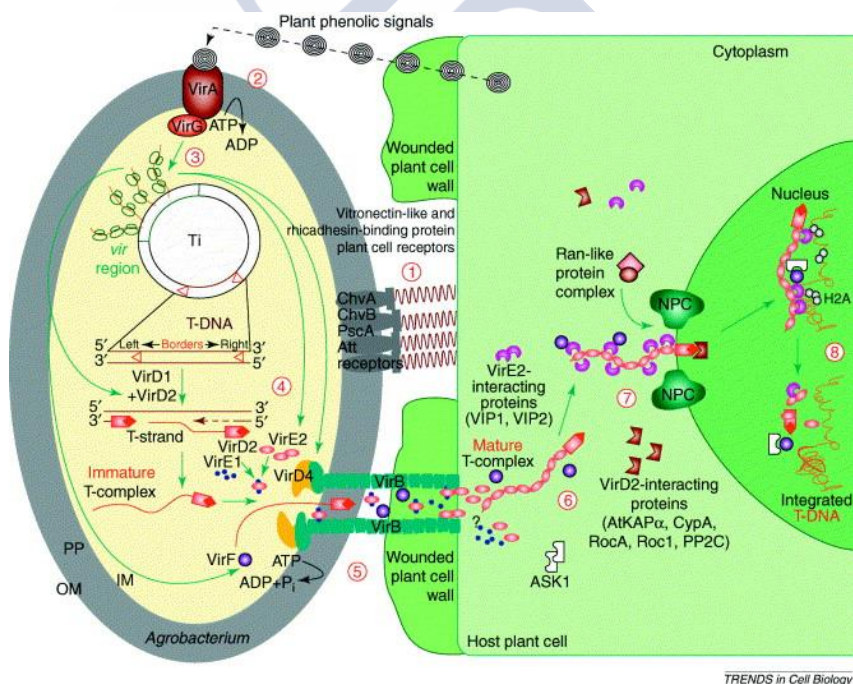


Figura 10: Esquema de la infección de *A. tumefaciens* (Tzfira y Citovsky, 2002)

La sustitución de estos genes del T-DNA por los genes que nos sean de interés es la base de este sistema de transformación genética (Cluster *et al.* 1994, Valpuesta, 2002). Además, el plásmido Ti se desarma, provocando que no sea oncogénico y mantenga la capacidad de transformación, y para ello lo que se hace es realizar una delección de la región ONC, OPS y OPC.

La ventaja de esta técnica es que es propensa a generar una única integración o un bajo número de ellas en el genoma con unos límites definidos, lo que evita en gran modo el

efecto del silenciamiento génico, asociado generalmente a una inserción múltiple de genes. Sin embargo, tiene la desventaja de que se necesita un paso específico en el protocolo para la eliminación de la bacteria con antibióticos, y en muchos casos es difícil que se produzca totalmente esta eliminación, pues la bacteria es capaz de mantenerse endógena en la planta (Kikkert *et al.* 2004).

Por otra parte, la vid puede ser infectada de manera natural por *Agrobacterium vitis* y se ha observado que cuando se utiliza la transformación con *A. tumefaciens* suele producirse una reacción hipersensible que se traduce en necrosis y *browning* impidiendo la regeneración (Bouquet *et al.* 2008). La adición al medio de antioxidantes, la utilización de un inóculo de bacteria muy diluido (Perl *et al.* 1996), y el estudio de diferentes medios y de genotipos de vid o explantes a transformar (Torregrosa *et al.* 2002) son algunas de las estrategias utilizadas para minimizar este problema.

Entre las cepas desarmadas de *A. tumefaciens*, LBA4404 (Hoekma *et al.* 1983), GV2206 (Ryder *et al.* 1985), EHA101 y EHA105 (Hood *et al.* 1993), GV3101 (Holsters *et al.* 1980), y AGL1 (Lazo *et al.* 1991), EHA105 es la más utilizada en la transformación de la vid (Scorza *et al.* 1996, Franks *et al.* 1998, Iocco *et al.* 2001, Wang *et al.* 2005, Dhekney *et al.* 2007 y 2011, Dutt *et al.* 2008, Dabauza *et al.* 2015, Li *et al.* 2015). Únicamente en un par de trabajos se ha utilizado *Agrobacterium rhizogenes* (Nakano *et al.* 1994, Franks *et al.* 2006).

### 3.7.2 TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR BIOLÍSTICA

La transformación por biolística (biología + balística) es un método físico de transformación desarrollado en la década de 1980 por Sanford y colaboradores, que se basa en la proyección a gran velocidad de micropartículas (generalmente de oro y tungsteno) impregnadas con ADN (“coating”). Las partículas impregnadas o tapizadas con el ADN de interés se colocan en una membrana y esta a su vez, sobre una rejilla metálica. En el cañón de la máquina se coloca una membrana de ruptura, que se rompe a una presión determinada, generando un “soplo” que impulsa a la membrana que tiene el ADN, haciendo que choque con la rejilla y propulsando las partículas a gran velocidad sobre el material vegetal (que puede ser callo embriogénico, suspensión celular, explantes de hoja, etc...) (Figura 11). Esto permite que las partículas atraviesen la pared celular y las membranas, y hace posible la integración del ADN que transportan en el genoma de las células vegetales (Kikkert *et al.* 2001).

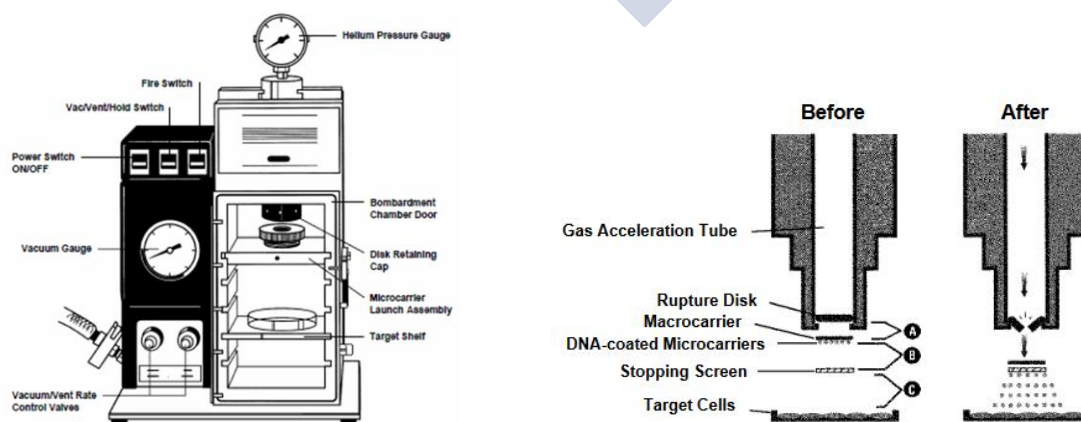


Figura 11: Sistema biolístico PDS 1000/He de BioRad®. [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

Las ventajas generales de esta técnica respecto a la infección con *A. tumefaciens* son: 1) Un mayor rango de huéspedes a transformar; 2) No es necesario un paso con antibióticos para eliminar el *Agrobacterium*, 3) No son necesarios plásmidos tan grandes para la transformación y se pueden utilizar incluso casetes mínimos (que contienen únicamente el promotor, el gen de interés, el gen de selección y el terminador). 4) Se evitan los falsos positivos producidos por el crecimiento de *Agrobacterium* en los tejidos. Además, en el caso particular de la vid se evita la reacción de hipersensibilidad que provoca la infección con *A. tumefaciens*.

Esta técnica es muy útil para realizar experimentos de transformación transitoria (Jelly *et al.* 2014; Vidal *et al.* 2010)

Sin embargo, la técnica tiene unos inconvenientes:

1) Existe una mayor dificultad para obtener transformantes estables, pues la posibilidad de que el ADN se inserte en los cromosomas es escasa; 2) Es habitual que hayan varias integraciones del gen en el genoma de la planta de manera estocástica, lo que puede producir el silenciamiento génico; 3) Los materiales a utilizar son caros; 4) El estrés físico generado en el material vegetal y la posible toxicidad que provocan las partículas utilizadas dificultan la regeneración; y 5) En muchos casos los individuos regenerados suelen ser quiméricos.

Una técnica especial que solo es posible mediante la biolística es el uso del gen limpio o *minimal cassette*. Esta técnica se basa en crear casetes para la transformación genética que solo contengan el promotor, el gen de interés y el terminador, con unas bases adicionales a ambos lados para protegerlo de las nucleasas (Fu *et al.* 2000). La ventaja de estos genes limpios es que, se evita la transformación con todo el esqueleto del vector, impidiendo así la integración de secuencias no deseadas en el genoma de la planta. Los casetes mínimos se pueden obtener a partir de plásmidos circulares por PCR utilizando enzimas con actividad de corrección de errores como la polimerasa *Pfu*. Para ello, se diseñarán cebadores específicos que contengan entre 10 y 15 nucleótidos correspondientes a los extremos 5' y 3' del casete y entre 20 y 30 nucleótidos de diseño libre. Se suelen utilizar casetes mínimos con el gen de interés con o sin el gen marcador, que puede estar en otro casete distinto. Los casetes mínimos anteriores se purifican y posteriormente se mezclan en la combinación deseada antes de realizar la cotransformación.

### 3.7.3 GENES MARCADORES

En un experimento de transformación la eficiencia de transformación suele ser baja y es necesario diferenciar los eventos de transformación entre todo el material no transformado. Esto es posible gracias a la acción de los genes marcadores, que se suelen integrar junto a los genes que queremos que se expresen en la planta. Existen dos tipos de genes marcadores, los de selección y los informadores.

#### 3.7.3.1 GENES MARCADORES DE SELECCIÓN

Estos genes permiten seleccionar a las células o plantas que los poseen en presencia de un agente selectivo, como un herbicida o un antibiótico, de manera que las plantas que no posean estos genes morirán en un medio de cultivo selector (se provoca una ventaja en medio selectivo). Un buen agente de selección es aquel que puede usarse en una dosis lo

suficientemente alta como para impedir la viabilidad de las células no transformadas y lo suficientemente baja como para no dañar las células transgénicas e inhibir la regeneración.

De estos genes, el más utilizado en *vid* es el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*), que confiere resistencia a antibióticos aminoglucósidos, como la kanamicina, la paramomicina o la neomicina (Nakano *et al.* 1994, Scorza *et al.* 1995 and 1996, Franks *et al.* 1998, Yamamoto *et al.* 2000, Iocco *et al.* 2001, Vidal *et al.* 2003 y 2006, Agüero *et al.* 2005, Bornhoff *et al.* 2005, Gambino *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005, Li *et al.* 2006, Dutt *et al.* 2008, López-pérez *et al.* 2008, Jin *et al.* 2009, Dhekney *et al.* 2011, Gago *et al.* 2011, Dabauza *et al.* 2015, Li *et al.* 2015). Este gen codifica una proteína que fosforila al antibiótico, desactivándolo.

A pesar de que en los trabajos de transformación de *vid*, el agente selectivo más utilizado es la kanamicina, Gray y Meredith (1992) mencionan que la *vid* tiene una alta sensibilidad a este antibiótico y su uso es complicado porque es difícil equilibrar la concentración adecuada para la selección y que no afecte al desarrollo de los embriones y plantas (Gray y Meredith 1992; Torregrosa *et al.* 2000; Saporta *et al.* 2014). Existe también diferente sensibilidad dependiendo del genotipo y el tipo de explante utilizado (Zhou *et al.* 2014). En algunos trabajos, se ha utilizado la paramomicina, obteniendo similares resultados que con la kanamicina (Wang *et al.* 2005), aunque no es común el uso de este antibiótico en los trabajos de transformación.

El segundo gen utilizado más comúnmente es el de la higromicina fosfotransferasa (*hptI*), que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Franks *et al.* 1998, Torregrosa *et al.* 2000, Fan *et al.* 2008, Nirala *et al.* 2010, Nookaraju y Agrawal 2012, Dai *et al.* 2015). Otros genes utilizados con éxito como agentes selectores en la *vid* han sido el gen *bar* (Perl *et al.* 1996) y *pml* (Reustle *et al.* 2003, Kieffer *et al.* 2004 y Jardak-Jamoussi *et al.* 2008), que codifican la fosfinotricina acetyl transferasa y la fosfomannosa isomerasa, respectivamente.

### 3.7.3.2 GENES INFORMADORES O “CHIVATOS”

Estos genes confieren a los organismos transformados una característica física que es fácilmente reconocible y que permite identificar y medir. Estos genes, una vez integrados, nos permitirán saber dónde se están expresando, en que cantidad, en que momento y en que tejidos se transcriben. En el caso de la transformación genética de plantas, nos permitirán discriminar fácilmente cuando ha habido una transformación exitosa.

Un ejemplo, y uno de los más utilizados, es el gen *uidA* que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa (Jefferson *et al.* 1987) llamado comúnmente GUS (Figura 12B). Esta proteína hidroliza sustratos como el X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucurónido) y provoca un precipitado de color azul. Otro ejemplo es el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*) que codifica una proteína que genera un cromóforo el cual emite fluorescencia verde cuando se excita con luz azul o luz ultravioleta (Figura 12A). En el primer caso, el método suele ser destructivo, mientras que en el segundo no lo es. En *vid* se utiliza tanto el *uidA* como el *gfp* (Baribault *et al.* 1989; Das *et al.* 2002; Dhekney *et al.* 2007; Dutt *et al.* 2007 y 2008; Franks *et al.* 1998; Gago *et al.* 2011; Iocco *et al.* 2001; Li *et al.* 2006; López-pérez *et al.* 2008; Nakano *et al.* 1994; Perl *et al.* 1996; Scorza *et al.* 1995; Wang *et al.* 2005).



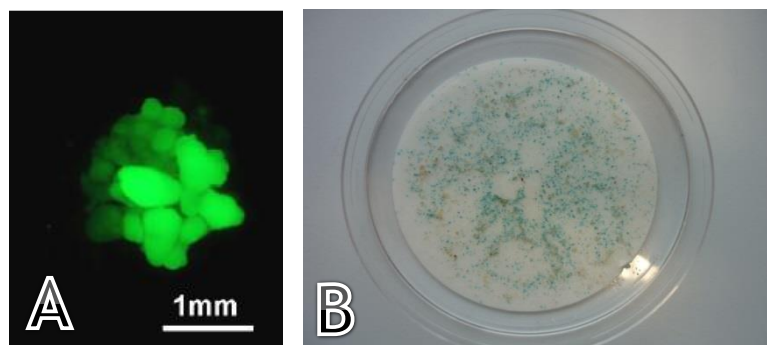


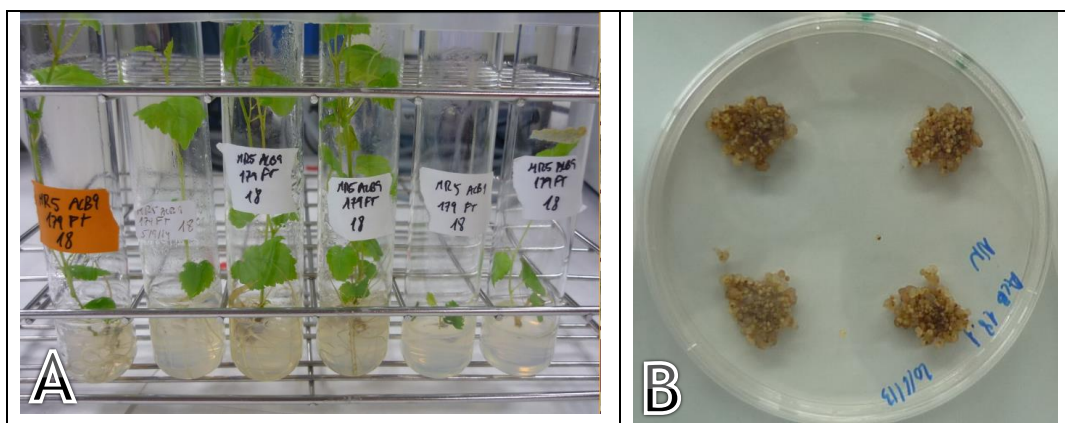
Figura 12: A: Embriones somáticos expresando *gfp* (Dutt *et al.* 2008). B: Eventos de transformación revelados mediante el sistema GUS en suspensión celular embriogénica transformada (Imagen propia).

Para determinar la inserción y expresión génica de los genes introducidos, no es suficiente solamente con los marcadores de selección. Para disponer de una prueba definitiva de ello se utilizan pruebas moleculares como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), RT-PCR (RetroTranscriptasa PCR), qPCR (PCR cuantitativa), Southern blot, etc...

### 3.8 CULTIVO *IN VITRO* Y REGENERACIÓN DE PLANTAS

Otra de las etapas fundamentales en la obtención de plantas transgénicas es el desarrollo de técnicas de regeneración del material transformado mediante cultivo *in vitro*. Esta metodología incluye un conjunto de técnicas que permiten que se pueda cultivar un explante tal como células, tejidos, órganos o plantas completas en un medio artificial de composición química determinada en condiciones de esterilidad. Esta técnica permite el cultivo y la propagación de grandes volúmenes de plantas en poco tiempo y espacio.

Las células de las plantas son totipotentes, tienen la capacidad para poder regresar al estado meristemático, aunque estas células ya estén diferenciadas. Además, tienen la capacidad de formar una nueva planta completa a partir de una célula desdiferenciada bien directamente del explanto (regeneración directa, Figura 13A) o con una fase intermedia en donde se genera un callo (conjunto de células sin diferenciar y desorganizado que proliferan juntas), en este caso, se denomina regeneración indirecta (Figura 13B).



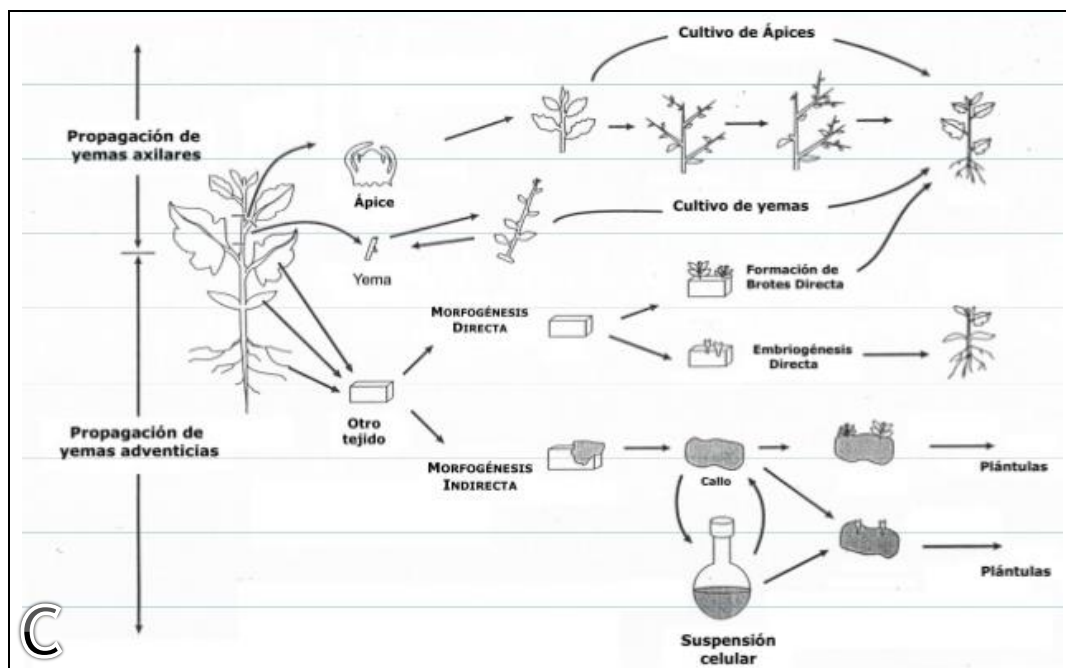


Figura 13: Diferentes explantos en cultivo *in vitro* de planta (A) y callo (B) (Imágenes propias). Abajo: Esquema de los distintos explantos posibles en cultivo *in vitro* (C) (Lindsey y Jones, 1989).

La respuesta morfogénica (Figura 13C) puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: la organogénesis y la embriogénesis. En la organogénesis se produce la formación de tallos, raíces u otras estructuras y en la embriogénesis se forman embriones que al germinar dan lugar a una planta. La regeneración de plantas *in vitro* vía organogénesis y embriogénesis somática permite que las células y tejidos mitóticamente quiescentes que se encuentran cumpliendo alguna función en alguna ruta de desarrollo, sean redirigidas hacia la formación de órganos o embriones. Como factores que pueden afectar a la regeneración están los explantos que se quieren regenerar, las condiciones del medio de cultivo, las condiciones climáticas (y microclimáticas) o incluso el genotipo de la planta. Es por ello que se han de utilizar medios de cultivo adecuados a cada tipo de explante y planta, para obtener las condiciones más favorables para el mantenimiento y regeneración.

Los medios de cultivo pueden ser sólidos o líquidos. Los medios sólidos suelen estar solidificados mediante el agar u otro agente gelificante. Además suelen llevar distintas cantidades de sales, como por ejemplo las sales Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) o sales Nitsch y Nistch (Nistch y Nistch, 1969), oligoelementos, vitaminas, azúcares, reguladores de crecimiento, antibióticos, etc...

El método más utilizado para obtener la esterilidad en los medios y el material es la esterilidad por calor húmedo en llamado autoclave, que genera en su interior vapor de agua a una temperatura determinada (generalmente 121 °C) y a una presión determinada (generalmente 1 atmósfera) que junto con un tiempo mínimo de 20 minutos, provoca la muerte de bacterias, hongos y esporas, y por tanto otorga la esterilidad.

Durante el cultivo *in vitro*, las plantas crecen en condiciones muy favorables, en ambientes con una humedad relativa alta. Cuando esas plantas se pasan a condiciones *ex vitro*, se necesita una etapa de aclimatación, donde las plantas han de adaptarse poco a poco y gradualmente a esas nuevas condiciones más desfavorables.

### 3.9 TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS

Para determinar la integración de los transgenes se utiliza la Polymerase Chain Reaction (PCR) que es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary Mullis en 1986 (Mullis *et al.* 1986). Esta técnica permite la copia de un fragmento de ADN millones de veces gracias a la utilización entre otros componentes de los enzimas ADN polimerasas, resistentes a altas temperaturas. Gracias a éste gran número de copias, se pueden visualizar los fragmentos amplificados en un gel de electroforesis. La reacción en cadena de la polimerasa ha cambiado el curso de las ciencias biológicas y biomédicas más que cualquier otra técnica inventada durante el siglo XX.

Existen otras variantes de la PCR como son la PCR en tiempo real o cuantitativa (utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN), o la RT-PCR (es la PCR por retrotranscriptasa o transcriptasa reversa, en donde el producto de amplificación es ADNc, el cual es producido en un primer paso por la retrotranscriptasa).

Otras técnicas utilizadas son el Southern (Southern, 1975) que se utiliza para la detección de secuencias específicas de ADN y el número de copias insertadas, el Northern (Alwine *et al.* 1977) basado en el anterior pero para ARN o el Western (Burnette, 1981) que se utiliza para identificar proteínas específicas.

Estas técnicas son importantes para la determinación a nivel molecular de la transferencia y expresión de los genes en la planta transformada. Aunque lo más importante es obtener el fenotipo esperado a esos genes.

### 3.10 TRABAJOS REALIZADOS EN TRANSFORMACIÓN GENÉTICA PARA LA MEJORA DE LA VID.

La transformación de *V. vinifera* se ha centrado en dos vertientes, la transformación transitoria para la caracterización funcional de genes y vías metabólicas (Vidal *et al.* 2010, Jelly *et al.* 2014) y la transformación estable sobre todo para la mejora de la resistencia a enfermedades o estrés (Saporta *et al.* 2016). En la Tabla 1 se han recopilado la mayoría de los trabajos realizados hasta ahora en transformación estable de *V. vinifera*. La mayor parte de ellos se han centrado en buscar la resistencia fúngica al Oidio (*Uncinula necator*) o a *Botrytis cinerea* y a patologías bacterianas como la enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa*). Otra gran parte de los trabajos busca la resistencia a una serie de virus de la vid, sobre todo con el GFLV (Virus del entrenudo corto infeccioso o Grapevine FanLeaf Virus), el Ringspot Virus del tomate, o los Grapevine virus (virus de la vid) A y B (GVA y GVB). Por último, una minoría de autores ha transformado buscando la resistencia a estreses abióticos, como por ejemplo la resistencia al frío.

Tabla 1: Trabajos de transformación genética enfocados a la producción y a la incorporación de genes relacionados con resistencia fúngica, bacteriana, vírica y de otros estreses en *V. vinifera* (Saporta *et al.* 2016). n.d: no determinada.

Resistencia a hongos y bacterias.			
Variedad	Gen(es)/Proteína(s)	Objetivo	Referencias
Thompson Seedless	Shiva-1 (Péptido lítico)	Resistencia bacteriana	Scorza <i>et al.</i> 1996
Chardonnay, Chancellor y	n.d. Quitinasa (endoquitinasa de <i>Trichoderma</i> )	Resistencia a Oídio	Kikkert <i>et al.</i> 1997

Merlot			
Riesling y Dornfelder	n.d. Quitinasa y n.d. glucanasa / n.d. Quitinasa y n.d. Ribosome inactivation protein (RIP)	Resistencia a enfermedades	Harst <i>et al.</i> 2000
Merlot y Chardonnay	<i>ThEn-42</i> (endoquitinasa de <i>Trichoderma harzianum</i> )	Resistencia al Oídio y a Botrytis	Kikkert <i>et al.</i> 2000, 2009
Neo Muscat	<i>RCC2</i> (Quitinasa de arroz)	Resistencia fúngica al Oídio	Yamamoto <i>et al.</i> 2000
Chardonnay	<i>mag2</i> (Peptido lítico)/ <i>MSI99</i> (Péptido lítico sintético)/PGL (Peptidyl-glycine-leucine)	Resistencia fúngica	Vidal <i>et al.</i> 2003
Thompson Seedless y Chardonnay	<i>pPgip</i> (Pear Polygalacturonase-inhibiting protein gene)	Aumentar la Resistencia a Botrytis	Agüero <i>et al.</i> 2005
Seyval blanc	n.d.Quitinasa y ribosome inactivation protein (RIP de <i>Hordeum vulgare</i> )	Resistencia a Uncinula necator y <i>Plasmopara viticola</i>	Bornhoff <i>et al.</i> 2005
Thompson Seedless	<i>STS</i> (Stilbene syntase de <i>Vitis reticulata</i> )	Fitoalexina para Resistencia fúngica	Fan <i>et al.</i> 2008
Pusa Seedless	<i>Chil1</i> (Quitinasa del arroz)	Resistencia fúngica al Oídio	Nirala <i>et al.</i> 2010
Chardonnay	<i>mag2</i> y PGL (Péptido lítico y peptidil-glycine-leucine respectivamente)	Resistencia al Oídio y a la agalla de cuello	Rosenfield <i>et al.</i> 2010
Thompson Seedless	<i>Vvttl-1</i> ( <i>Vitis vinifera</i> thaumatin-like protein)	Resistencia fúngica al Oídio y a la roña negra de la vid. También obtener resistencia a Botrytis	Dhekney <i>et al.</i> 2011
Thompson Seedless	PGIP péptido señal con un dominio lítico derivado de cecropin	Resistencia a la enfermedad de Pierce	Dandekar <i>et al.</i> 2012
Crimson Seedless	<i>Chi1</i> (quitinasa de trigo scab-infected Sumai-3)/ $\beta$ -1,3-glucanase (del mismo trigo que el anterior)	Aumentar la tolerancia al mildiu	Nookaraju y Agrawal 2012
Sugraone	<i>VstI</i> (Grapevine stilbene syntase)	Mejorar la resistencia al grey mould ( <i>B. cinerea</i> )	Dabauza <i>et al.</i> 2015
Chardonnay	<i>VpSTS</i> ( <i>Vitis pseudoreticulata</i> stylbene sintase)	Resistencia al Oídio	Dai <i>et al.</i> 2015
Thompson Seedless	LIMA-A (Gen sintético que codifica un péptido lítico)	Mejorar la resistencia a la enfermedad de Pierce	Li <i>et al.</i> 2015
Thompson Seedless	<i>ech42</i> (Endoquitinasa)/ <i>ech33</i> (Endoquitinasa)/ <i>nag70</i> (N-acetyl-b-Dhexosaminidase gene)	Incrementar la resistencia a <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Erysiphe necator</i>	Rubio <i>et al.</i> 2015
Red Glove	<i>VpPR4-1</i> (Pathogenesis-related protein from <i>Vitis pseudoreticulata</i> )	Incrementar la resistencia al oídio.	Dai <i>et al.</i> 2016
Thompson Seedless	<i>VaTLP</i> (proteína tipo thaumatin relacionada con la patogénesis (PR))	Incrementar la resistencia al mildiu.	He <i>et al.</i> 2017
Thompson Seedless	<i>VpRH2</i> (gen de ubiquitina ligasa tipo RING-H2)	Incrementar la resistencia al oídio.	Wang <i>et al.</i> 2017
<b>Resistencia a virus</b>			
Chardonnay	GFLV CP (Grapevine FanLeaf Virus Coat Protein)	Resistencia a Grapevine FanLeaf Virus	Mauro <i>et al.</i> 1995
Thompson Seedless	TomRSV-CP (Tomato RingSpot Virus Coat Protein)/Shiva-1 (péptido lítico)	Resistencia a virus y bacterias	Scorza <i>et al.</i> 1996
Rusalka	GFLV CP (Grapevine FanLeaf Virus Coat Protein)/ArMV CP (Arabidopsis mosaic virus Coat Protein)/GVA CP (Grapevine virus A Coat Protein)/GVB CP (Grapevine virus B Coat Protein)	Resistencia a Grapevine FanLeaf Virus, Arabis Mosaic Virus, Grapevine Virus A y B	Gölles <i>et al.</i> 1997, 1998
Superior Seedless	n.d. MP (Movement Protein)	Resistencia a Grapevine	Martinelli <i>et al.</i> 1998



		Virus A y B	
Rusalka	GFLV CP (Grapevine FanLeaf Virus Coat Protein)	Resistencia al Grapevine FanLeaf Virus	Tsvetkov <i>et al.</i> 2000
Rusalka	GFLV CP (Grapevine FanLeaf Virus Coat Protein)	Resistencia al Grapevine FanLeaf Virus	Gutoranov <i>et al.</i> 2001
Nebbiolo, Blaufränkisch y Lumassina	GFLV CP (Grapevine FanLeaf Virus Coat Protein)	Resistencia al Grapevine FanLeaf virus	Gambino <i>et al.</i> 2005
Arich dressé	IR MPc GFLV (Inverted Repeat silencing Movement Protein de GFLV)	Resistencia al Grapevine FanLeaf Virus	Jardak-jamoussi <i>et al.</i> 2008
<b>Otros</b>			
Cabernet Franc	n.d. Fe-superoxido dismutasa	Tolerancia a la congelación	Rojas <i>et al.</i> 1997
Rusalka	Arf 11 (Antifreeze protein)/Arf 62 (Antifreeze protein)/Arf 75 (Antifreeze protein)/B5 (Antifreeze protein)	Resistencia al frío	Gutoranov <i>et al.</i> 2001
Sultana	<i>CYP79A</i> and <i>Cyp71E1</i> (Codifica citocromo p450 de <i>Sorgum</i> )/ <i>sbHMNGT</i> (UDPG glucosyltransferase-encoding de <i>Sorgum</i> )	Resistencia a Phylloxera	Franks <i>et al.</i> 2006
n.d. <i>Vitis vinifera</i> (cultivar sin semillas)	PPOa (Polyphenol oxidasa antisentido)/UFGT (UDP:flavonoid 3-O-glucosyltransferase)	Reducción de niveles de PPO ("browning" de tejidos dañados) y color de la baya	Thomas y Scott 2001
Thompson Seedless y Silcora	<i>DefH9-iaaM</i> (Protein that increase the IAA formation)	Aumentar el número de flores y bayas	Mezzetti <i>et al.</i> 2002 y Constantini <i>et al.</i> 2007
Portan	<i>VvAdh2</i> ( <i>Vitis vinifera</i> Alcohol Dehydrogenase)	Resistencia a estrés abiótico	Tesniere <i>et al.</i> 2006
Centennial Seedless	<i>AtDREB1b</i> (Dehydration response element binding is a cold-inducible transcription factor in <i>Arabidopsis thaliana</i> )	Resistencia al frío	Jin <i>et al.</i> 2009
Brachetto	<i>VvPIP2;4N</i> gene (PIP-type aquaporine gene)	Resistencia a estrés hídrico	Perrone <i>et al.</i> 2012
Chardonnay	<i>pART27-42</i> (RNA interference silencing a conserved Root-Knot nematode effector gene <i>16D10/pART27-271</i> )	Resistencia a Root-Knot nematodes	Yang <i>et al.</i> 2013

En referencia a la resistencia a hongos se han utilizado proteínas relacionadas con patogénesis (PR), de las cuales las glucanasas y quitinasas son las más comunes (Harst *et al.* 2000, Kikkert *et al.* 2000 y 2009, Yamamoto *et al.* 2000, Bornhoff *et al.* 2005, Nirala *et al.* 2010, Nookaraju y Agrawal 2012, Rubio *et al.* 2015, Dai *et al.* 2016, He *et al.* 2017). También la acumulación de fitoalexinas como los estilbenos son utilizadas para obtener resistencia fúngica (Ferreira *et al.* 2004, Fan *et al.* 2008, Dabauza *et al.* 2015, Dai *et al.* 2015).

En cuanto a bacterias, se han utilizado genes antimicrobianos (péptidos líticos) (Scorza *et al.* 1996, Vidal *et al.* 2003 y 2006, Kikkert *et al.* 2009, Rosenfield *et al.* 2010, Dandekar *et al.* 2012, Li *et al.* 2015).

Para obtener resistencia a virus como el GFLV, GVA o GVB, se han utilizado la inserción de proteínas de la cápside del virus (virus coat proteins; CP) (Gölles *et al.* 1997 y 1998, Tsvetkov *et al.* 2000, Gutoranov *et al.* 2001, Gambino *et al.* 2005). También se han usado proteínas de movimiento (movement virus proteins) (Martinelli *et al.* 1998) o ARN de interferencia (Jardak-Jamoussi *et al.* 2008).

Se ha intentado también mediante transformación la introducción de resistencias a nematodos (Yang *et al.* 2013) o a phylloxera (Franks *et al.* 2006), la resistencia a estreses abióticos como el frío (Rojas *et al.* 1997, Gutoranov *et al.* 2001, Tesniere *et al.* 2006, Jin *et al.* 2009), aumentar el rendimiento generando un mayor número de flores y partenocarpia

(Mezzetti *et al.* 2002, Constantini *et al.* 2007) o disminuir el “browning” y controlar el color de la baya (Thomas y Scott 2001).

Por último, cabe destacar que la transformación genética de la vid todavía tiene muchas dificultades y no todas las variedades tienen la capacidad de ser transformadas. Esto se puede poner en evidencia observando que la gran mayoría de los trabajos se centran en variedades como la ‘Thompson Seedles’ o ‘Chardonnay’, las cuales, al parecer, tienen más facilidad para ser transformadas.





## **OBJETIVOS**



## 4. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es la puesta a punto de protocolos para la transformación de las variedades de vid ‘Tempranillo’ y ‘Albariño’, de gran importancia en distintas DOPs y la introducción de los genes *VvFT* y *Vvgai* relacionados con la floración temprana.

Para ello se proponen los siguientes hitos:

1. **Obtención de cultivos embriogénicos de vid para utilizar como material de partida en los distintos ensayos:** estudio de la influencia del genotipo, material de partida y medio de cultivo.
2. **Evaluación de distintos factores que influyen en la transformación vía biolística y/o mediada por *Agrobacterium tumefaciens*:** influencia de diferentes tipos y tamaños de partícula, velocidades de agitación de las partículas durante la adherencia del ADN a las partículas (*coating*) y evaluación del tipo y concentración de los agentes selectivos.
3. **La construcción de vectores portadores de los genes *VvFT* y *Vvgai*.**
4. **Obtención de plantas transgénicas de ‘Tempranillo’ y ‘Albariño’ portadoras de los genes *VvFT* y *Vvgai* utilizando el método biolístico y la transformación mediada por *Agrobacterium*.**
5. **Análisis de las plantas transformadas.**





## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó como material vegetal de partida estaquillas de dos variedades de vid, el cultivar ‘Albariño’ y el cultivar ‘Tempranillo’ recogidas en campo.

### 5.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGENESIS

Para los experimentos de transformación, se utilizaron dos tipos de material vegetal: callos embriogénicos de vid y suspensiones celulares establecidas a partir de los primeros. La obtención de ambos se describe a continuación.

#### 5.1.1 OBTENCIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL EXPALNTE DE PARTIDA Y EL MEDIO DE CULTIVO

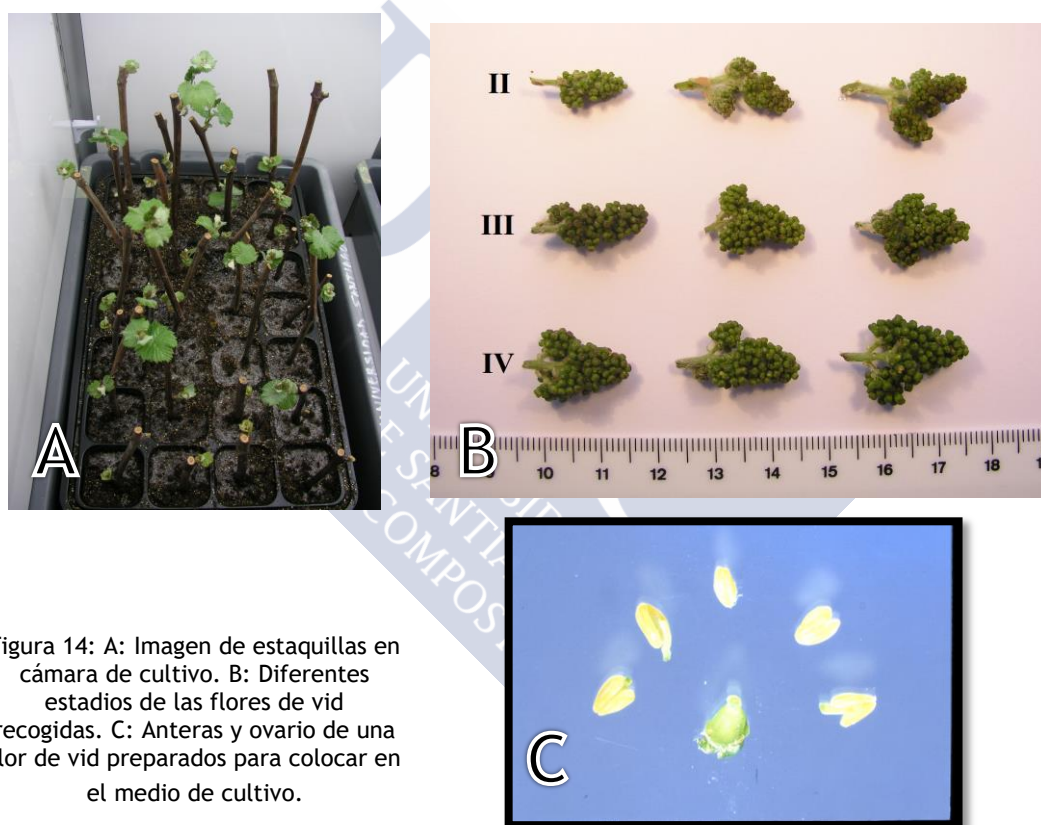


Figura 14: A: Imagen de estaquillas en cámara de cultivo. B: Diferentes estadios de las flores de vid recogidas. C: Anteras y ovario de una flor de vid preparados para colocar en el medio de cultivo.

Se siguieron los protocolos de Perrin *et al.* (2004) y Kikkert *et al.* (2005). En primer lugar, se recogieron estaquillas de los cultivares ‘Albariño’ y ‘Tempranillo’ durante la poda y en el laboratorio se bañaron en un antifúngico (Rovral 2,5 gL<sup>-1</sup> durante 30 minutos). Transcurrido ese tiempo, se secaron con papel de filtro y se envolvieron en papel film. Tras esto, se almacenaron en cámara fría a 4 °C durante 3 meses. Pasado este tiempo, a las estaquillas se les realizó un corte en la zona inferior (para facilitar su enraizamiento) y se colocaron en unos alvéolos con una mezcla de 66% turba y 33% vermiculita estéril dentro de una cámara de crecimiento (germinador) a 25 °C y con una luminosidad de 6’5.10<sup>3</sup> lux.

A los 20-25 días, las estaquillas comenzaron a generar las inflorescencias, que se fueron recogiendo en los distintos estadios de las flores (II, III y IV según el sistema de Gribaudo *et al.* 2004) (Figura 14 A y B).

Al mismo tiempo que se realizaba la recolección de las flores en la cámara de crecimiento de las dos variedades ('Albariño' y 'Tempranillo'), también se recogieron inflorescencias crecidas en campo de las mismas variedades y en los mismos estadios de floración.

Tras la recolección de las flores, se realizaron unos tratamientos de descontaminación para el adecuado establecimiento *in vitro*. Para ello, se utilizó un tratamiento (Kikkert *et al.* 2005) que consiste en un baño del tejido en alcohol al 70% durante 1 minuto, seguido de un baño en agua estéril durante 2 minutos y otro posterior en hipoclorito sódico al 1,5% (p/v) con dos gotas de Tween 20 durante 15 minutos. Tras ese tiempo, se aclaró en agua estéril durante 5 minutos, repitiendo 3 veces cambiando el agua. El tratamiento se realizó en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar.

Seguidamente, se seleccionaron las inflorescencias en los distintos estadios de floración y mediante unas pinzas de punta fina, un bisturí y una lupa binocular, se extrajeron el ovario y las anteras de las flores (Figura 14 C), colocando los tejidos por separado en placas con medios MSE y NNE (ver Anexo 1.2.3 y 1.2.4) (10 ovarios y 50 anteras aproximadamente por placa) (Vidal *et al.* 2009). Las placas se colocaron en cámaras de crecimiento a  $25\pm1$  °C y en oscuridad. A partir de ese momento, y con periodicidad mensual, se cambiaron los explantes a medio fresco hasta que crecieron y se diferenciaron los callos embriogénicos. A los 6 meses estos callos fueron seleccionados, numerados y se cultivaron en distintas placas para mantener cada línea separada. Los callos se mantuvieron en los mismos medios de los que provenían y se continuo renovando el medio de cultivo durante 2 meses más. Transcurrido ese tiempo, se transfirieron a medio C<sub>1</sub>P (ver Anexo 1.2.8) (Torregrosa, 1998). El número total de explantes puede observarse en la Tabla 2.

Tabla 2: Número de anteras (A) y ovarios (O) de las variedades 'Albariño' y 'Tempranillo' indicando la procedencia, el medio utilizado (MSE o NNE) y los estadios florales (II, III o IV).

Cultivar	Procedencia	Medio	Órgano	Estadio	nº placas	nº explantes
Albariño	Germinador	MSE	A	II	9	450
Albariño	Germinador	MSE	A	III	8	400
Albariño	Germinador	MSE	A	IV	9	450
Albariño	Germinador	NNE	A	II	8	400
Albariño	Germinador	NNE	A	III	9	450
Albariño	Germinador	NNE	A	IV	5	250
Albariño	Germinador	MSE	O	II	7	140
Albariño	Germinador	MSE	O	III	8	160
Albariño	Germinador	MSE	O	IV	7	140
Albariño	Germinador	NNE	O	II	8	160
Albariño	Germinador	NNE	O	III	9	180
Albariño	Germinador	NNE	O	IV	8	160
Albariño	Campo	MSE	A	II	4	200
Albariño	Campo	MSE	A	III	4	200
Albariño	Campo	MSE	A	IV	4	200
Albariño	Campo	NNE	A	II	4	200
Albariño	Campo	NNE	A	III	4	200
Albariño	Campo	NNE	A	IV	4	200
Albariño	Campo	MSE	O	II	4	80

Albariño	Campo	MSE	O	III	4	80
Albariño	Campo	MSE	O	IV	4	80
Albariño	Campo	NNE	O	II	4	80
Albariño	Campo	NNE	O	III	4	80
Albariño	Campo	NNE	O	IV	4	80
Tempranillo	Germinador	MSE	A	II	9	450
Tempranillo	Germinador	MSE	A	III	8	400
Tempranillo	Germinador	MSE	A	IV	4	200
Tempranillo	Germinador	NNE	A	II	8	400
Tempranillo	Germinador	NNE	A	III	9	450
Tempranillo	Germinador	NNE	A	IV	4	200
Tempranillo	Germinador	MSE	O	II	8	160
Tempranillo	Germinador	MSE	O	III	8	160
Tempranillo	Germinador	MSE	O	IV	4	80
Tempranillo	Germinador	NNE	O	II	8	160
Tempranillo	Germinador	NNE	O	III	8	160
Tempranillo	Germinador	NNE	O	IV	4	80
Tempranillo	Campo	MSE	A	II	4	200
Tempranillo	Campo	MSE	A	III	4	200
Tempranillo	Campo	MSE	A	IV	4	200
Tempranillo	Campo	NNE	A	II	4	200
Tempranillo	Campo	NNE	A	III	4	200
Tempranillo	Campo	NNE	A	IV	4	200
Tempranillo	Campo	MSE	O	II	4	80
Tempranillo	Campo	MSE	O	III	4	80
Tempranillo	Campo	MSE	O	IV	4	80
Tempranillo	Campo	NNE	O	II	4	80
Tempranillo	Campo	NNE	O	III	4	80
Tempranillo	Campo	NNE	O	IV	4	80

### 5.1.2 OBTENCIÓN DE LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS Y SUSENSIONES CELULARES: MATERIALES BASE PARA LA TRANSFORMACIÓN

Una vez obtenidos y multiplicados los callos embriogénicos, se prepararon las suspensiones celulares que fué el material vegetal utilizado para los experimentos de biolística (figura 15). Para ello se utilizaron matraces Erlenmeyer de 50 mL estériles con 15 mL de medio de cultivo GM+NOA (ver Anexo 1.2.9) (Wang *et al.* 2002, Vidal *et al.* 2003) en condiciones de esterilidad, en los cuales se introdujo una cantidad aproximada de 200 mg de callo embriogénico, se desmenuzó con cuidado con unas pinzas estériles para separar dentro de lo posible el material vegetal y que quedara bien disgregado por el medio. Estos matraces se dejaron en oscuridad a 20-24 °C y en agitación (en agitador orbital a 100 rpm). Cada semana posterior se realizó el refresco del medio de cultivo, que consistió en eliminar la mitad del volumen y añadir de nuevo la mitad de medio fresco (De la Torre *et al.* 2012).

Para el total establecimiento del cultivo de las suspensiones celulares hizo falta aproximadamente entre 6 y 8 semanas, durante las cuales se hicieron refrescos semanales, y cada dos semanas se duplicó el volumen (Tabla 3). Entre la semana 6 y 7 se filtraron las suspensiones con un embudo que lleva una malla de 1 mm de poro con el objetivo de eliminar los agregados celulares de mayor tamaño, de manera que finalmente se obtuvo un matraz de 100 mL con 60 mL de suspensión celular. Dependiendo del uso, se llevó el volumen final a 120 mL de suspensión celular en un matraz de 250 mL para disponer de

suficiente material para llevar a cabo la experimentación. A partir de ese momento se refrescó cada semana y se realizaron los tratamientos de filtrado según evolucionó el cultivo (De la Torre *et al.* 2012). Las suspensiones se mantuvieron en condiciones de crecimiento exponencial para que fueran competentes para la transformación genética y la regeneración de plantas (Kikkert *et al.* 2004). Según se requirió, se iniciaron nuevas suspensiones a medida que las anteriores envejecían.

Tabla 3: Programa de refrescos semanales para las suspensiones celulares de vid.

Semana	Tratamiento	Volumen total (mL)
1 <sup>a</sup>	Inicio: 200 mg de callo	15
2 <sup>a</sup>	Refresco	15
3 <sup>a</sup>	Doblar	30
4 <sup>a</sup>	Refresco	30
5 <sup>a</sup>	Doblar	60
6 <sup>a</sup>	Refresco	60
7 <sup>a</sup>	Filtrar (malla 1 mm)	60
8 <sup>a</sup>	Doblar	120

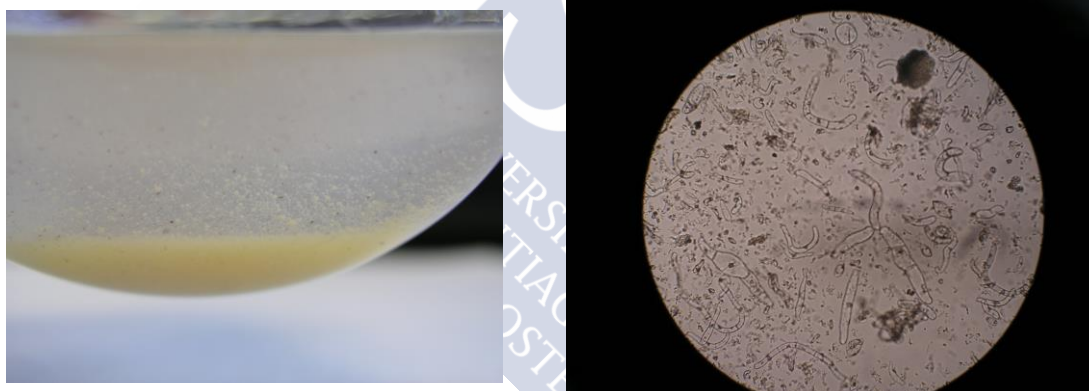


Figura 15: Izquierda: Imagen de una suspensión celular de 'Albariño'. Derecha: Células de vid en suspensión celular al microscopio. Imágenes propias.

Una vez conseguido el material vegetal, se utilizaron los callos embriogénicos para iniciar suspensiones celulares y para su uso en los experimentos de transformación con *A. tumefaciens*, mientras que las suspensiones celulares se utilizaron en los experimentos de transformación por biolística y para la puesta a punto de esta técnica.

## 5.2 PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA DE TRANSFORMACIÓN

En los experimentos de transformación por biolística se utilizó el protocolo de Kikkert *et al.* (2004) modificando alguno de los pasos como, la velocidad de agitación, el tipo y tamaño de partícula o la concentración de antibióticos de selección a utilizar que se especifican a continuación.

Para contar los eventos de transformación producidos en los experimentos se utilizó la tinción GUS. El gen *uidA* que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa está presente en el

plásmido pBI426 utilizado en estos ensayos (Datla *et al.* 1991). Esta tinción se realizó poniendo en contacto las células transformadas con una solución del sustrato X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt) y dejándolas durante la noche en una estufa a 37 °C, lo que provoca un precipitado azulado. La composición de esta solución figura en el Anexo 1.1.6. Posteriormente se contaron en las placas el número de puntos azules en una lupa binocular de forma manual. Cada punto corresponde a un evento de transformación transitoria.

#### 5.2.1 INFLUENCIA DEL TIPO Y TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA.

Se preparó un experimento para comprobar si existían diferencias en el uso de partículas de oro de 1 micra, de 0,6 micras, una mezcla 50:50% de las dos anteriores y con partículas de tungsteno (Bio-Rad) y dióxido de titanio (proporcionadas por el Instituto de Cerámica de la Universidad de Santiago de Compostela).

En primer lugar se esterilizaron todas las partículas con el mismo método utilizado para la esterilización de oro según el protocolo (Kikkert *et al.* 2004) y se alicuotó en tubos con 50 µL de agua/glicerol al 50% (v/v) que contenían un total de 3 mg de partículas. Se prepararon 3 tubos para cada tratamiento.

Para el experimento, se utilizó como material vegetal una suspensión celular de Albariño (AlbX22.2) y el plásmido pBI426. En primer lugar se dispensaron 5 mL de suspensión celular en las placas de medio sólido siguiendo el protocolo de transformación por biolística de Kikkert *et al.* (2004). Posteriormente se realizaron 3 bombardeos por tratamiento con un total de 12 placas (3 placas por tratamiento). Finalmente se realizó la prueba GUS a las placas y se contaron los puntos azules.

#### 5.2.2 COMPARACIÓN DE VELOCIDADES DE AGITACIÓN DEL ORO EN LA ADHERENCIA A LA PARTÍCULA

Con este experimento se quiso comprobar los efectos de las distintas velocidades de agitación durante el paso de agitación del oro y su resuspensión, en la fase del *coating* (adherencia del ADN a las paredes de la partícula) del oro del protocolo de Kikkert *et al.* (2004).

Para ello se utilizó como material vegetal, una suspensión celular del cultivar ‘Tempranillo’ (línea Tempranillo 12) y se transformó con el plásmido pBI426 siguiendo el protocolo de transformación descrito, pero en la fase de agitación del oro, se emplearon 3 tratamientos distintos: agitación a 500 rpm, a 1000 rpm y a 2000 rpm, durante 10 minutos. Para ello se dispararon 6 placas por tratamiento. Tras los disparos se realizó la lectura de los puntos azules de la placa por el método GUS de forma manual con lupa binocular.

#### 5.2.3 AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICOS PARA LA SELECCIÓN DE PLANTAS TRANSFORMADAS

Se utilizaron distintas suspensiones celulares de los cultivares ‘Albariño’ y ‘Tempranillo’ generadas a partir de callos embriogénicos, las cuales fueron filtradas y cuantificadas para que tuvieran una densidad celular de 0,1 PCV (*packed cell volume*). El medio de cultivo utilizado fue el MS/2CA (ver Anexo 1.2.6) al que se le añadió un rango de concentraciones de 2 antibióticos: el antibiótico kanamicina (a concentraciones de 0, 10,



20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 100 mgL<sup>-1</sup>) y el antibiótico higromicina (a concentraciones de 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 y 25 mgL<sup>-1</sup>), que son los antibióticos de selección para los genes de resistencia que contienen los plásmidos pGreenI 29 y pGreenII 179 respectivamente, que se usarían para los experimentos de transformación finales. Posteriormente se colocaron 5 mL de suspensión celular (0,1 PCV) de manera homogénea en un disco de papel de filtro Whatman (nº2), con la ayuda de una bomba para eliminar el medio de la suspensión celular, tras lo cual esos filtros se colocaron en los distintos medios de cultivo.

Se estudiaron los efectos en 5 líneas del cv. ‘Albariño’ y 3 del cv. ‘Tempranillo’ para el antibiótico kanamicina y 3 de ‘Albariño’ y 1 ‘Tempranillo’ para el antibiótico higromicina. Se ensayaron 5 placas por cada concentración de antibiótico que posteriormente al ensayo fueron incubadas a 27 °C durante 3 meses en oscuridad. Cada mes se midió el número de embriones emergentes mayores de 5 mm y se cambió el soporte de papel a medio fresco.

Para observar la viabilidad de los embriones tras el uso de antibióticos se recogieron embriones de más de 5 mm que germinaron en medios con distintas concentraciones de antibióticos determinadas mediante un experimento de optimización de antibióticos previo con la línea Albariño 26. Para ello, se seleccionaron embriones de 3 meses de edad de las concentraciones de antibiótico de 5, 10 y 15 (mgL<sup>-1</sup>) de kanamicina y de 2, 4, 6 y 8 de higromicina y unos embriones control sin antibióticos (la cantidad de embriones depende de la disponibilidad). Estos embriones se colocaron en los medios de cultivo con sales MS/2CA y WP (ver Anexo 1.2.2) sin antibióticos con el objetivo de observar cuántos de ellos continuaban su desarrollo pasado un mes. Después de pasar ese tiempo, se contabilizaron aquellos que todavía continuaban vivos (tabla 4).

Tabla 4: Embriones seleccionados de los distintos medios con antibióticos.

Concentración antibióticos (mgL <sup>-1</sup> )	Número de embriones iniciales		
	En MS/2CA	En WP	Totales
Kanamicina			
5	14	13	27
10	5	5	10
15	5	5	10
Higromicina			
2	55	55	110
4	56	61	117
6	25	25	50
8	6	5	11
Controles			
0	46	40	86

Con el objetivo de conocer el porcentaje de regeneración de planta de los embriones, se generaron embriones a partir de una suspensión celular de ‘Albariño’ 26. Para ello, se dispensó 1 mL de esa línea sobre un papel de filtro Whatman nº1 con una bomba de vacío en condiciones de esterilidad, y posteriormente ese papel se colocó en medio MS/2CA en placa. Tras un mes, se recogieron embriones de más de 5 mm y se colocaron en tubos con medio MS/2CA o medio WP. Pasado otro mes adicional en estos medios, se contabilizó aquellos que germinaron y desarrollaron hojas verdaderas (Tabla 5).

Tabla 5: Número de embriones utilizados para cada medio de cultivo.

Línea embriogénica	Medio MS/2CA	Medio WP
Alb 26.1	13	13
Alb 26.4	10	10
Alb 26.4	10	10
Embriones Totales	33	33

Los embriones que germinaron se transfirieron a tubos de ensayo con medio renovado y tras 30 días se midió la altura de las plantas desde la base hasta el ápice de 10 plantas de cada uno de los medios, para observar qué medio de cultivo favorecía un mejor desarrollo de la planta.

### 5.3 ELABORACIÓN DE PLÁSMIDOS Y EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACIÓN PARA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *VvFT* Y *VvGAI*

Mientras crecía el material vegetal, se procedió a la construcción de los plásmidos necesarios para las transformaciones.

#### 5.3.1 PLÁSMIDOS PGREEN.

Para la construcción de los plásmidos que se utilizarían para la transformación, se eligió la colección de plásmidos pGreen (<http://www.pgreen.ac.uk/>) (Hellens *et al.* 2000). Este tipo de plásmidos son unos de los más utilizados para la transformación de plantas (Watson *et al.* 2016). Uno de los motivos de escoger este plásmido fue su pequeño tamaño (alrededor de 5 kb), ya que la eficiencia de los procesos de recombinación es inversamente proporcional al tamaño del plásmido (Sambrook *et al.* 1989). Contienen las regiones conocidas como *right* y *left borders* que limitan la zona de transferencia, donde se colocan los genes a insertar. Además, según la versión del pGreen, tiene incluido un gen de resistencia a antibióticos como la kanamicina (*nptII*) o a la higromicina (*hptI*), el cual se utilizaron para la posterior selección de las plantas transformadas. Para poder introducir los genes de interés en los plásmidos, se usó el casete del plásmido pJit60 (también de la colección pGreen), el cual contiene un doble promotor 35S y el terminador CaMV. Este casete fue transferido después al esqueleto de los plásmidos pGreenI 29 y pGreenII 179 (Figura 16).

Los plásmidos utilizados para la construcción de los vectores de transformación fueron:

- pGreenI 29: Contiene el gen de resistencia al antibiótico kanamicina. Se selecciona con kanamicina.
- pGreenII 179: Contiene el gen de resistencia al antibiótico higromicina. Se selecciona con higromicina.
- pJit60: Contiene un doble promotor 35S y el terminador CaMV. Se selecciona con el antibiótico carbenicilina.

- pSoup: Contiene el origen de replicación de los plásmidos pGreen. Se selecciona con el antibiótico tetraciclina.

### 5.3.2 OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DE PLÁSMIDOS PORTADORES DE LOS GENES *VvFT* Y *VvGAI* A UTILIZAR EN LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACIÓN

#### 5.3.2.1 TRANSFORMACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* CON LOS PLÁSMIDOS pJIT60, pSOUP, pGREENI 29 Y GREENII 179

Los plásmidos fueron solicitados a [www.pgreen.ac.uk](http://www.pgreen.ac.uk), a la razón de Mark Smedley, JohnInnesCentre, NorwichResearchPark, Colney, Norwich, UK (Figura 16).

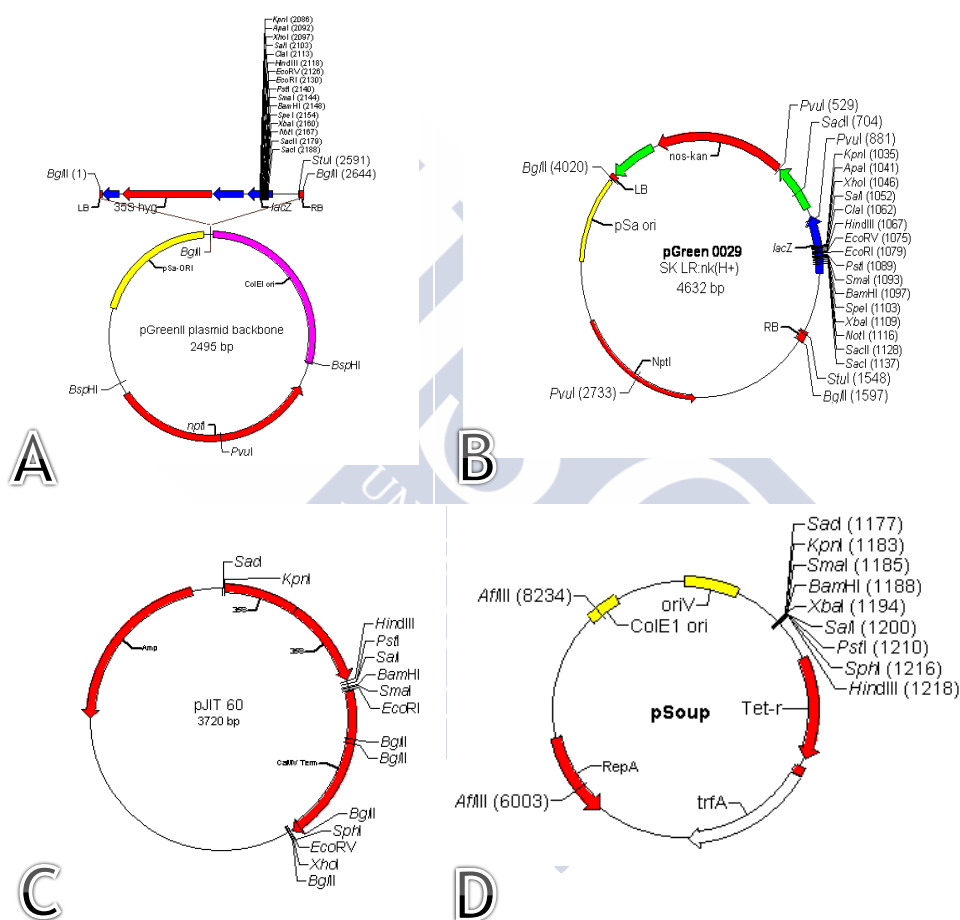


Figura 16: Plásmidos de la colección pGreen utilizados. A: pGreenII 179, B: pGreenI 29, C: pJit60 y D: pSoup.

Se realizó una transformación de células de *E. coli* competentes (Mandel y Higa, 1970; Molholt, 1978) con los plásmidos pGreen mediante la técnica de choque térmico (células competentes de la bacteria se ponen en contacto con el plásmido, tras lo cual se incuban en hielo 30 minutos, y posteriormente se les aplica un choque térmico a 42 °C durante 1 minuto y 40 segundos, después se pone en hielo de nuevo durante 5 minutos, tras lo que se les añade medio LB (Bertani, 1951) (ver Anexo 1.2.5) con el antibiótico necesario para mantener cada plásmido y se les hace crecer). Seguidamente se puso una



alícuota en placas de medio LB sólido con antibiótico y se les hizo crecer a 37 °C durante la noche.

Después de este paso, se eligieron colonias bacterianas y se inocularon en medio líquido para que continuaran creciendo lo suficiente para poder realizar una *miniprep* y así se pudiera obtener el plásmido en mucha cantidad para poder utilizarlo posteriormente.

### 5.3.2.2 CLONACIÓN DE LOS GENES *VVGAI* Y *VvFT* EN EL PLÁSMIDO PJIT60

En primer lugar, se procedió a realizar una extracción de ADN del mutante de vid L1 del cultivar ‘Pinot Meunier’ que contiene la combinación de alelos salvaje/mutante *VvGAI/Vvgai* (a partir de ahora le llamaremos únicamente *Vvgai* para abreviar) (Boss y Thomas, 2002). Para ello se recogieron hojas jóvenes de la planta en un tubo Eppendorf y se congelaron en nitrógeno líquido, tras lo cual se trituraron utilizando un pistilo e, inmediatamente después, se realizó la extracción de ADN con el kit DNeasy 96 Plant kit de Qiagen® siguiendo su protocolo. Después de la extracción, se congelaron las muestras para su posterior uso.

Para la obtención del gen *VvFT* se utilizó el plásmido pROKII.FT3, cedido por la doctora María José Carmona (Carmona *et al.* 2007a).

A continuación, se diseñaron los cebadores para la clonación de los genes *Vvgai* y *VvFT* utilizando la secuencia de los genes publicados (Boss y Thomas, 2002 y Carmona *et al.* 2007a). Estos cebadores tienen una diana de restricción (*EcoRI* y *PstI*) adicionada para poder realizar un corte con enzimas de restricción y generar extremos cohesivos, además de 4 bases extra para proteger esas dianas (GAGA).

#### *Vvgai*

Directo: 5'-GAGACTGCAGATGAAGAGGGAGTATCATCATC-3'.

Reverso: 5'-GAGAGAATTCTCAGTTGGAGGCAGGTGTG-3'.

#### *VvFT*

Directo: 5'-GAGACTGCAGATGCCTAGGGAAAGGGATCC-3'.

Reverso: 5'-GAGAGAATTCTTATGATCTTCCACCACCCG-3'.

Posteriormente, se realizó una prueba para evaluar la temperatura óptima de la enzima Pwo Polymerase (una polimerasa *proof-reading* y termoestable, con una extremadamente baja tasa de error de la casa Sigma-Aldrich) y los cebadores diseñados, utilizando 10 temperaturas entre 45 °C y 65 °C (Anexo 1.3.3). Tras cada reacción se visualizó el producto en un gel de agarosa (10 µL). Se usaron los marcadores de peso λHindIII y GeneRuler 1 Kb (Anexo 1.3.4) en el gel para poder estimar los tamaños de las bandas.

Para la MasterMix final de 50 µL, se utilizó 25 µL de cada una de las MasterMix (25 µL de la 1 y 25 µL de la 2) (Tabla 6). El programa para el gradiente usado fue el mostrado en el Anexo 1.3.3.

Los geles obtenidos pueden verse en el Anexo 2.1. Para el gen *Vvgai*, la temperatura óptima fue entre 58,7 y 61,1 °C correspondientes a las bandas 7 y 8 respectivamente (la banda número 9 falló en la amplificación), mientras que para el gen *VvFT* no hubo diferencias entre las temperaturas, así que se escogieron las amplificaciones 1 y 2. Además, se escogieron las bandas de esos carriles que tenían el tamaño adecuado al gen (1770 pb para el *Vvgai* y 525 pb para el *VvFT*) y una buena cantidad de ADN (entre

400 y 550 ng $\mu$ L<sup>-1</sup> aproximadamente). Se eligieron 2 bandas para el *Vvgai* (bandas 7 y 8) y 2 bandas para el *VvFT* (bandas 1 y 2). Se realizó una purificación de las bandas de PCR seleccionadas con el kit QIAquick PCR Purification de Qiagen®. Se preparó una doble digestión de los productos de la PCR de la purificación de las bandas elegidas más la banda número 6 sin purificar para el *Vvgai* (para estimar posibles diferencias). También se cortó el plásmido pJIT60 con los enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* y una doble digestión (DD) con el buffer Tango para crear los extremos cohesivos que luego se unirá con una ligasa (Tabla 7). Se dejaron entre 2 y 3 horas a 37 °C para que los enzimas pudieran cortar por sus dianas totalmente.

Tabla 6: Mastermix utilizadas para la PCR con la Pwo Polymerase.

<b>MasterMix 1</b>	<b>[I]</b>	<b>[F]</b>	<b>1 muestra (<math>\mu</math>L)</b>
<b>Agua</b>	-	-	13
<b>dNTPs</b>	10 mM	200 $\mu$ M	1
<b>Cebador 5'</b>	10 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M	3
<b>Cebador 3'</b>	10 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M	3
<b>DNA</b>	20 ng $\mu$ L <sup>-1</sup>	100 ng	5
<b>MasterMix 2</b>	<b>[I]</b>	<b>[F]</b>	<b>1 muestra (<math>\mu</math>L)</b>
<b>Agua</b>	-	-	19,5
<b>Buffer+MgSO4</b>	10x	1x	5
<b>PWO</b>	5 $\mu$ L <sup>-1</sup>	2,5u/reacción	0,5

Tabla 7: Cantidades de los productos utilizados para las digestiones (en microlitros).

	<b><u>Purificación <i>Vvgai</i></u></b>			<b><u>Purificación <i>VvFT</i></u></b>		<b><u>PJit60</u></b>		
<b>Banda</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>DD</b>	<b><i>EcoRI</i></b>	<b><i>PstI</i></b>
<b>Agua</b>	24	14	14	14	14	14	15	15
<b>Buffer</b>	4	4	4	4	4	2	2	2
<b>DNA</b>	10	20	20	20	20	2	2	2
<b><i>EcoRI</i></b>	1	1	1	1	1	1	1	-
<b><i>PstI</i></b>	1	1	1	1	1	1	-	1
<b>Total</b>	40	40	40	40	40	20	20	20

Tras la incubación, se preparó un gel con 0,8% de agarosa y se colocó 20  $\mu$ L de cada muestra (de manera que se tuvieron 2 pocillos de cada muestra y 1 de cada digestión del pJit60 para el *Vvgai*) (Anexo 2.2). Se utilizó el marcador  $\lambda$ HindIII. Posteriormente, las bandas digeridas se cortaron con un bisturí y se realizó a continuación la extracción del ADN utilizando el kit Nucleic Protein Purification de Macherey-Nagel®. El tamaño del gen *Vvgai* es de aproximadamente 1,7 kb, el del *VvFT* es de 0,5 kb y el del pJit60 es de 3,7 kb. Tras la purificación, se consiguió aproximadamente 15  $\mu$ L de cada banda de muestra y 25 ng $\mu$ L<sup>-1</sup> de ADN de las bandas del plásmido. Se procedió a la ligación de las muestras 7 y 8 del *Vvgai* y 1 y 2 del *VvFT* utilizando la Ligasa T4 (Thermo-Fisher Scientific®), con una relación vector:inserto de 1:3 y 20  $\mu$ L de volumen de ligación. Como controles de la ligación se utilizaron las digestiones de *PstI* y *EcoRI* del plásmido pJit60 (positivos) y la doble digestión (negativo) (Tabla 8).

Tabla 8: Resumen de las diferentes ligaciones (incluidas controles).

Ligaciones
Banda <i>Vvgai</i> 7 + DD pJit60
Banda <i>Vvgai</i> 8 + DD pJit60
Banda <i>VvFT</i> 1 + DD pJit60
Banda <i>VvFT</i> 2 + DD pJit60
DD pJit60 (control -)
<i>Pst</i> I pJit60 (control +)
<i>Eco</i> RI pJit60 (control +)

Después de la ligación, se realizó la transformación de células competentes de *E.coli* por medio de la transformación por choque térmico. Para ello se usó el volumen de ligación diluido una vez. Se hizo la transformación de las células con 7 ligaciones (la ligación 7 y 8 del *Vvgai* y la 1 y 2 del *VvFT*, más 3 ligaciones control) y con el pJit60 que será el control positivo de la transformación. Se hicieron 3 placas con medio de cultivo LB con el antibiótico carbenicilina 50 mgL<sup>-1</sup> (Car50) para la selección de las colonias transformadas, ya que el plásmido pJit60 contiene el gen de resistencia a este antibiótico. Para cada ligación, se inoculó el medio con volúmenes de 10, 100 y 200 microlitros. Se dejó crecer a 37 °C durante una noche. Al día siguiente se observó el crecimiento de las bacterias con los siguientes resultados:

- Las placas con las ligaciones de los cortes de *Eco*RI y *Pst*I tuvieron un buen crecimiento, con lo que la ligación funcionó bien.
- Del mismo modo, las placas con el plásmido pJit60 también tuvieron un buen crecimiento.
- La transformación con las ligaciones de la doble digestión del pJit60 y los genes de interés tuvieron un crecimiento moderado (entre 20 y 45 colonias en las placas de 10 µL).
- La placa de la doble digestión tuvo muy poco crecimiento (5 colonias), debido seguramente a que no se digirió todo el plásmido.

De las placas de las ligaciones del *Vvgai* (7 y 8) y del *VvFT* (1 y 2), se seleccionaron colonias bacterianas para hacer una selección. Se utilizó la técnica de PCR con los cebadores de la clonación del *Vvgai* y *VvFT* (utilizados anteriormente) con la Taq Gold Polymerase (Thermo-Fisher Scientific®). El programa de PCR utilizado fue: desnaturalización (95 °C, 10 segundos), hibridación (94 °C, 1 minuto, 58 °C, 30 segundos, 72 °C 3 minutos con 35 ciclos) y extensión final (72 °C 10 minutos).

Además, de las colonias seleccionadas se guardaron una representación en placas con medio LB y Car50.

Se utilizó un gel al 1% de agarosa y los marcadores de peso λHindIII y GeneRuler 1kb, y los controles pJit60 (negativo), ADN del cultivar ‘Pinot Meunier’ mutante para el *Vvgai* 2 (PM2) (positivo), pROKII.FT3 positivo para el *VvFT* y mastermix sin ADN (negativo) (Anexo 2.3).

También se hizo una prueba de selección por tamaño con un protocolo con Fenol-Cloroformo, pero en este caso solo se hizo con el *Vvgai*, por considerar que no hacía falta para el *VvFT* (Anexo 2.4).

Según los geles resultantes, para el *Vvgai* se escogieron las colonias de las muestras 7 (2 y 8) y 8 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13 y 15), pues dieron los mejores resultados. Para las

colonias del *VvFT* se escogieron las colonias 1 y 2 de la segunda banda, pues los controles salieron mejor que para las de la primera. Con las colonias seleccionadas, se inoculó con una proporción 1:1000 en medio LB con Car50 y se dejó crecer a 37 °C y 300 rpm no más de 16 horas en un agitador orbital. Al día siguiente y tras el crecimiento se realizaron *minipreps* de todas las muestras con el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen® para obtener el plásmido que contenga el gen de interés.

Para comprobar que las bacterias tienen el gen *Vvgai* se realizaron unas digestiones del ADN obtenido en las *minipreps* con *Pst*I+*Eco*RI y *Sac*I+*Xho*I y también para generar el cassette del gen, que consiste en una construcción que contiene el doble promotor 35S, el gen de interés y el terminador CAMV (contenido todo en el plásmido pJit60), el cual luego se utilizó para unirlo a otro plásmido. Estas digestiones se dejaron a 37 °C durante 3 horas. En el caso del *VvFT*, además de estas dos digestiones, se utilizó *Sac*I+*Eco*RI, *Sac*I y *Eco*RI. Después de las digestiones se hizo un gel al 1% de agarosa en el que se pusieron los marcadores  $\lambda$ HindIII y el GeneRuler 1 kb, dos colonias, las digestiones, la doble digestión y un control del gen *Vvgai* (Anexo 2.5) pudiéndose comprobar que todas las muestras en la digestión *Pst*I+*Eco*RI tenían el gen *Vvgai* (que como se ve en el anexo estaba liberado del casete 3,7 kb y 1,8 kb del *Vvgai*) y en el caso de la otra digestión (*Sac*I+*Xho*I), como estaba unido al doble promotor y al terminador (3,3 kb casete y 2'2 kb el esqueleto). En el caso del *VvFT*, se pudo observar cómo se liberaba el gen *VvFT* en el caso de la digestión 1, y como las otras digestiones daban bandas apropiadas para los cortes determinados. Con este resultado, se obtuvo el gen *VvFT* integrado en el plásmido PJit60. Se continuó con el *Vvgai* para separar la versión salvaje y mutante del gen *VvGAI/Vvgai* (las cuales se diferencian en una base que modifica un aminoácido del *Vvgai*). Para ello, se utilizó la técnica del dCAPs (Neff *et al.* 1998), que es una técnica para el análisis genético de un polimorfismo de nucleótido simple. Para ello, en primer lugar, se hizo un gradiente de temperatura para la PCR para ver la temperatura de (rango 30-50 °C) óptima de hibridación de los cebadores para el dCAPs. Se utilizó para ello la TaqGold Polimerase. Los cebadores usados fueron como directo el de la clonación 5' (*Vvgai* 5' (*Pst*I)) y como reverso el *Vvgai* 3' *Xho*I:CAPS (CTTGACGTTGTAGCCCCAAAACCTCG) que contiene una diana *Xho*I. Tras la visualización de los fragmentos un gel de agarosa al 1% (Anexo 2.6) se seleccionó la temperatura de hibridación de 50 °C por ser la banda que más amplificó y más definida era.

Se realizó otra PCR con la temperatura seleccionada para las diferentes *minipreps* de las muestras y parte de la reacción se observó en un gel con el marcador de peso de peso molecular 100 pb y el  $\lambda$ HindIII (como controles se pusieron *Vvgai* PM2 (planta mutante 'Pinot Menier' 2)(+), pJit60 (-) y agua (-))(Anexo 2.7). Con el resto de la reacción se realizó una digestión con el enzima *Xho*I (37 °C durante 4 horas) que es el enzima que corta para el dCAPs: Un corte se corresponde con el alelo salvaje, pues el cebador le ha insertado unos *missmatches* (errores) para crear una diana de restricción. Si no se produce corte se ven bandas más grandes que corresponden a la versión mutante. Como control se puso un producto de la PCR normal (en este caso el 8.1). Se preparó un gel de agarosa al 2,5% y como marcador se usó el marcador de peso GeneRuler 100 bp (Anexo 1.3.4) (Figura 17).

Se seleccionaron las colonias 8-1 y 8-13 para continuar, pues tienen el gen mutado *Vvgai*.

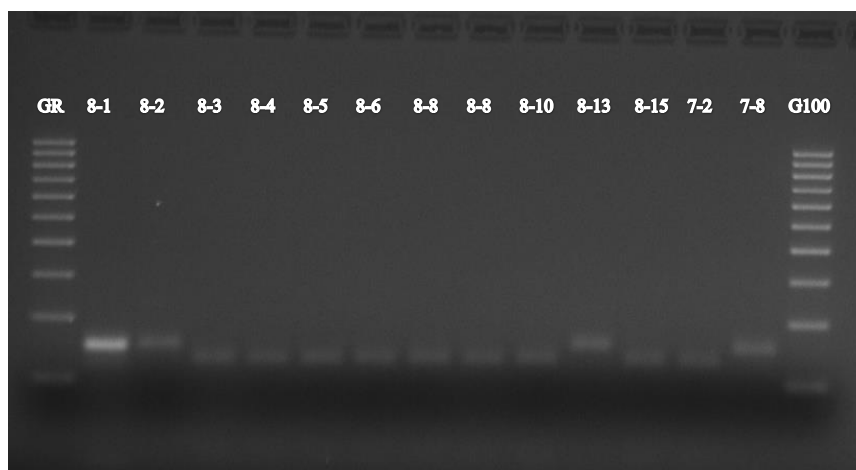


Figura 17: Visualización de los productos de la digestión con el enzima *XhoI* de las colonias transformadas. Las colonias con las bandas más grandes (las que corren menos) son las que contienen el alelo mutante del gen (pocillos 1, 2, 10 y 13). Como marcador de peso se utilizó el GeneRuler 100 pb (G100).

Estas colonias se mandaron a secuenciar (Sistemas Genómicos, Valencia) para comprobar que el gen *Vvgai* estaba bien insertado en el plásmido, con lo que se tendría el gen de interés en el plásmido pJit60 para poder utilizarlo para la extracción del casete y colocarlo en el plásmido final para la transformación (Tabla 9).

Tabla 9: Comparativa entre las secuencias de la colonia pJit60 8-1(*Vvgai*) y la accesión del NCBI correspondiente al gen *Vvgai* (AF378125). En verde la mutación que provoca la insensibilidad a giberelinas.

<i>Vvgai</i> AF378125 vs. PJit60+8-1 ( <i>Vvgai</i> )				
AF378125	123	AGAGGGAGTATCATCATCCTCATCACCCAACCTTGCTCCACGTCACCGGCAAGGGTA		182
PJit60+8-1	41	AGAGGGAGTATCATCATCCTCATCATCCAACCTTGCTCCACGTCACCGGCAAGGGTA		100
AF378125	183	AGATGTGGGATGCCGACCCCCAGCAAGACGCCGGCATGGATGAGCTTC	CGCTGTTTTGG	242
PJit60+8-1	101	AGATGTGGGATGCCGACCCCCAGCAAGACGCTGGCATGGATGAGCTTC	CGCTGTTTTGG	160
AF378125	243	GCTACAACGTCAAGGCCTCCGACATGGCTGAGGTCGCTCAGAAGCTTGAACAGCTTGAGG		302
PJit60+8-1	161	GCTACAACGTCAAGGCCTCCGACATGGCTGAGGTCGCTCAGAAGCTTGAACAGCTTGAGG		220

### 5.3.2.3 INSERCIÓN DEL CASETE DEL PJIT60+*VVGA*I Y PJIT60+*VVFT* EN LOS PLÁSMIDOS PGREEN.

El procedimiento fue aislar los casetes del *Vvgai* y *VvFT* e insertarlos en los plásmidos pGreenII 179 y pGreenI 29, que son adecuados tanto para la transformación por biolística como para la transformación por *Agrobacterium*.

Para ello, en primer lugar, y con los plásmidos pGreen, se hizo una digestión con los mismos enzimas que el casete del pJit60, para que luego se pudiera hacer la ligación. Por ello, se realizó una digestión doble con *SacI* y *XhoI*, para el pJit60+*Vvgai*, el pJit60+*VvFT* y para el pGreenII 179 y pGreenI 29. Para cada una de las digestiones se puso en un tubo 10 µL de agua, 2 µL de Buffer de digestión, 1 µL de cada enzima y 6 µL de ADN. Con estas digestiones se liberarían los casetes de los genes de interés, del esqueleto del pJit60 y se abrirían los esqueletos de los pGreen.

Con una alícuota de esta digestión, se preparó un gel con los marcadores de peso λHindIII y GeneRuler 1 kb para comprobar los cortes y recuperar la banda. En el caso del



*Vvgai*, en los carriles del pJit60 se observaban 3 bandas que son (de mayor a menor) el plásmido sin digerir, el casete *Vvgai* y el esqueleto. En los carriles de los plásmidos pGreen se observaba la banda del plásmido cortado. En el último carril apareció una banda extraña, así que lo descartamos (Figura 18).

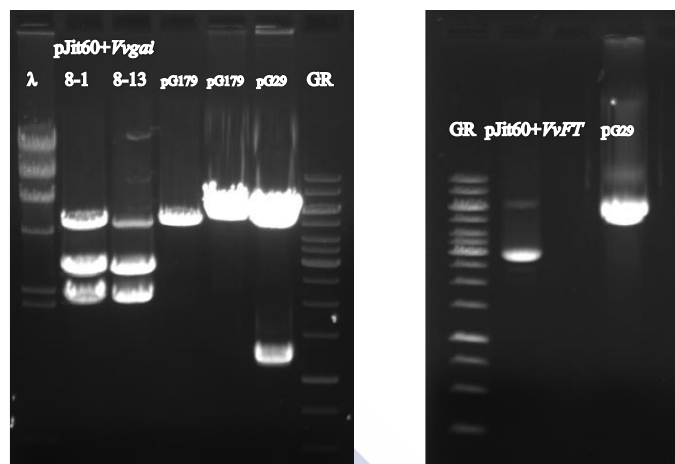


Figura 18: Visualización de los geles con las digestiones con *SacI* y *XhoI*. Izquierda: Colonias *Vvgai* y plásmidos pGreenII 179 y pGreenI 29. Derecha: Colonia *VvFT* y plásmido pGreen29.

Se utilizó otro tubo de plásmido pGreen 29 (se comprobó que no aparecía la banda extraña) para continuar con la transformación.

Seguidamente, se cortó el gel con un bisturí y se purificaron las bandas extraídas tal como se ha descrito anteriormente. Con una muestra de la purificación, se comprobó mediante electroforesis que los cortes estaban bien y se cuantificó la cantidad de ADN de la purificación con un Picodrop.

A continuación se realizó una ligación de los casetes pJit60+*Vvgai* y pJit60+*VvFT* con los esqueletos de los plásmidos pGreen, con una relación vector: inserto de 1:2. y controles negativos y seguidamente se transformó *E. coli* mediante choque térmico con estas ligaciones. Como anteriormente, se sembraron placas de 10, 100 y 200  $\mu\text{L}$  de bacterias utilizando medio LB al que se añadió 50  $\text{mgL}^{-1}$  del antibiótico kanamicina (agente de selección de las colonias del pGreen). Las colonias crecidas se analizaron para determinar la presencia de plásmido (Figura 19).

En el caso del *Vvgai*, con estos resultados, se seleccionaron las colonias pGreen179-1, pGreen179-4 y la pGreen29-1 y en caso de *VvFT* la pGreen179-1, pGreen179-7, pGreen29-1 y pGreen29-2. Estas colonias se crecieron en medio con antibiótico y seguidamente se realizó una *miniprep* y se cuantificó el ADN mediante Picodrop. Con este ADN, se procedió a realizar unas digestiones para comprobar las ligaciones y si se tenía el casete del pJit60+*Vvgai* y pJit60+*VvFT* en los plásmidos (Tabla 10). Las digestiones fueron 7 en total. Se incubaron durante 6 horas a 37 °C.

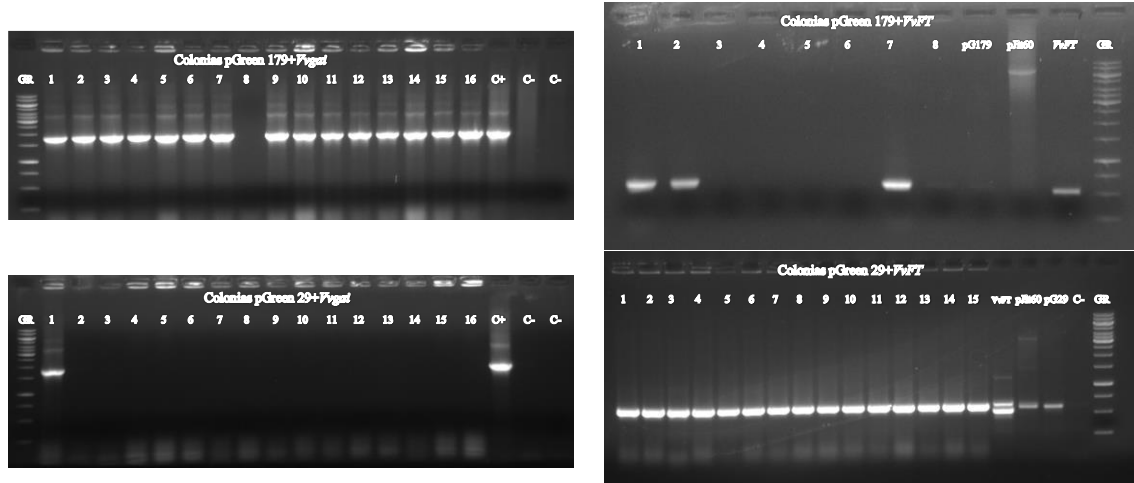


Figura 19: Visualización de los productos de PCR con las colonias transformadas con los cebadores con los que se amplificó las colonias de ligación. Izquierda *Vvgai* (arriba con el plásmido pGreen179 y abajo con el plásmido pGreen29). Derecha *VvFT* (arriba colonias con el plásmido pGreen179 y abajo con el plásmido pGreen29). Marcador de peso GeneRuler 1 Kb (GR)

Tabla 10: Digestiones realizadas a las colonias seleccionadas. Los tamaños en kb son aproximados.

Digestión	Cortes	Tamaños (kb) 179+ <i>Vvgai</i>	Tamaños (kb) 179+ <i>VvFT</i>	Tamaños (kb) 29+ <i>Vvgai</i>	Tamaños (kb) 29+ <i>VvFT</i>
<i>SacI</i>	Cortará por un lugar al plásmido	8,4	7,1	7,9	6,6
<i>XhoI</i>	Cortará por un lugar al plásmido	8,4	7,1	7,9	6,6
<i>EcoRI</i>	Cortará por un lugar al plásmido	8,4	7,1	7,9	6,6
<i>PstI</i>	Cortará por un lugar al plásmido	8,4	7,1	7,9	6,6
<i>SacI</i> + <i>XhoI</i>	Liberará al casete y al esqueleto	5,1+3,3	5,1+2,2	4,6+3,3	4,6+2
<i>EcoRI</i> + <i>PstI</i>	Liberará el gen de interés y el esqueleto	6,6+1,8	6,6+0,5	6,1+1,8	6,1+0,5
<i>EcoRI</i> + <i>SacI</i>	Liberará el gen con el promotor y el esqueleto	5,9+2,5	5,8+1,3	5,4+2,5	5,3+1,3

Tras la incubación se llevó a cabo una electroforesis para visualizar los plásmidos, utilizando todas las digestiones, los genes *Vvgai* y *VvFT* (una amplificación por PCR del gen realizada con anterioridad), y el ADN de la *miniprep* sin digerir, de manera que se pudiera comprobar que todo estaba correcto. Finalmente se enviaron los plásmidos a secuenciar (Sistemas Genómicos, Valencia) comprobándose de forma definitiva que las ligaciones y transformaciones fueron adecuadas y, por tanto, se podían utilizar esos plásmidos para realizar las transformaciones genéticas.

Para finalizar, se realizó una *maxiprep* de las bacterias seleccionadas que tenían todos los plásmidos para poder conseguir un *stock* adecuado. De la *maxiprep* se alicuotaron *stocks* a  $1 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ . También se llevó a cabo una secuenciación para comprobar que durante este proceso no había habido ningún cambio en los genes de interés.

#### 5.3.2.4 TRANSFORMACIÓN DE *A. TUMEFACIENS* CON LOS PLÁSMIDOS OBTENIDOS.

Para realizar el proceso de transformación con los plásmidos obtenidos, en primer lugar, se prepararon células electrocompetentes de *A. tumefaciens* según Torregrosa *et al.* (2015). Se utilizó la cepa EHA105, que proviene de la cepa hipervirulenta de *A.*

*tumefaciens* A281 (Hood *et al.* 1993), y que tiene como agente selector el antibiótico rifampicina y posteriormente se llevó a cabo la electroporación. El protocolo utilizado se describe en el Anexo 3.1.

### 5.3.3 TRANSFORMACIÓN MEDIANTE BIOLÍSTICA DE SUSPENSIONES CELULARES PARA INTRODUCIR LOS GENES *VvFT* Y *Vvgai* EN LOS CULTIVARES ‘ALBARIÑO’ Y ‘TEMPRANILLO’

El protocolo de transformación mediante biolística está basado en el protocolo original de Kikkert *et al.* (2004) en el que se especifica que todos los reactivos deben ser de grado cultivo de tejidos o biología molecular. Los pasos del protocolo se han de realizar en una cabina de flujo laminar y con materiales esterilizados para evitar contaminaciones. Este protocolo está descrito en su totalidad en el Anexo 3.2.

Se realizaron un total de 33 experimentos de transformación mediante biolística siguiendo el protocolo descrito anteriormente, con las dos variedades, diferentes líneas, y los plásmidos pGreen29+*VvFT*, pGreen179+*VvFT*, pGreen29+*Vvgai*, pGreen179+*Vvgai* y PBI426 (para ver la eficiencia de transformación). Estos fueron realizados durante diferentes años y dependiendo del material disponible (Tabla 11).

Tabla 11: Experimentos de transformación mediante biolística durante 3 años con los plásmidos con los genes de floración temprana.

Experimento	Año	Variedad	Línea	Plásmidos	Placas
1	2011	Albariño	25,3	pGreen29- <i>Vvgai</i>	12
2	2011	Albariño	25,2	pGreen179- <i>Vvgai</i>	12
3	2011	Tempranillo	1,3	pGreen179- <i>Vvgai</i>	3
4	2011	Albariño	25,3,2	pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
		Tempranillo	1,4	pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
5	2011	Albariño	C1	pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
6	2012	Albariño	25,2	pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
7	2012	Albariño	25,4,1	pGreen179- <i>Vvgai</i>	5
8	2012	Albariño	25,4	pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
				pGreen179- <i>VvFT</i>	6
9	2012	Albariño	C5	pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
				pGreen179- <i>VvFT</i>	6
				pGreen29- <i>Vvgai</i>	6
10	2012	Albariño	20,1	pGreen29- <i>VvFT</i>	6
				pGreen179- <i>VvFT</i>	6
				pGreen29- <i>Vvgai</i>	6
11	2012	Albariño	1,1	pGreen29- <i>VvFT</i>	6
				pGreen179- <i>VvFT</i>	6
				pGreen29- <i>Vvgai</i>	6
12	2012	Albariño	18,1	pGreen29- <i>VvFT</i>	6
				pGreen179- <i>VvFT</i>	6
				pGreen29- <i>Vvgai</i>	6
13	2012	Albariño	18,2	pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
				pGreen29- <i>VvFT</i>	3
				pGreen179- <i>VvFT</i>	5
14	2012	Albariño	3,2	pGreen29- <i>Vvgai</i>	3
				pGreen179- <i>Vvgai</i>	3
				pGreen29- <i>Vvgai</i>	6
15	2012	Albariño	25,1	pGreen29- <i>Vvgai</i>	6
				pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
				pGreen29- <i>VvFT</i>	6
16	2012	Albariño	25	pGreen29- <i>VvFT</i>	6
				pGreen179- <i>VvFT</i>	6
				pGreen29- <i>Vvgai</i>	6
17	2012	Albariño	24,1	pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
				pGreen29- <i>VvFT</i>	6
				pGreen179- <i>VvFT</i>	6
18	2012	Albariño	3,2,1	pGreen29- <i>Vvgai</i>	6
				pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
				pGreen29- <i>VvFT</i>	6
19	2012	Albariño	25,2	pGreen179- <i>Vvgai</i>	6
				pGreen29- <i>VvFT</i>	6
				pGreen179- <i>VvFT</i>	6



				pGreenI29-Vvgai	6
				pGreenII179-Vvgai	6
20	2012	Tempranillo	C42	pGreenI29-VvFT	6
				pGreenII179-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
21	2012	Albariño	22,1	pGreenII179-VvFT	6
				pGreenII179-Vvgai	6
22	2012	Albariño	3,2,1	pGreenI29-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
23	2012	Albariño	24,1	pGreenI29-VvFT	6
				pGreenII179-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
				pGreenII179-Vvgai	6
24	2013	Albariño	21	pGreenI29-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
25	2013	Albariño	22	pGreenII179-VvFT	6
				pGreenII179-Vvgai	6
26	2013	Albariño	18,1	pGreenI29-VvFT	6
				pGreenII179-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
				pGreenII179-Vvgai	6
27	2013	Albariño	22,3	pGreenI29-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
28	2013	Albariño	18	pGreenII179-VvFT	6
				pGreenII179-Vvgai	6
29	2013	Albariño	22,2	pGreenII179-VvFT	3
				pGreenI29-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
30	2013	Albariño	22	pGreenI29-VvFT	6
				pGreenII179-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
				pGreenII179-Vvgai	6
31	2013	Albariño	34	pGreenI29-VvFT	6
				pGreenII179-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
				pGreenII179-Vvgai	6
32	2013	Albariño	22,1	pGreenI29-VvFT	6
				pGreenII179-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
				pGreenII179-Vvgai	6
33	2013	Albariño	22	pGreenI29-VvFT	6
				pGreenII179-VvFT	6
				pGreenI29-Vvgai	6
				pGreenII179-Vvgai	6

#### 5.3.4 INTRODUCCIÓN DE LOS GENES *VvFT* Y *Vvgai* MEDIANTE TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR *A. TUMEFACIENS*.

El protocolo utilizado está basado en el protocolo de transformación de vid de Torregrosa *et al.* (2002 y 2015) y Bouquet *et al.* (2006). Todos los pasos del protocolo se efectúan en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar.

Se realizaron un total de 9 experimentos de transformación con las variedades de vid ‘Tempranillo’ y ‘Albariño’ y con las construcciones de pGreen179+*VvFT* y pGreen179+*Vvgai* (Tabla 12) siguiendo el protocolo de transformación con *Agrobacterium* descrito anteriormente.

Tabla 12: Experimentos de transformación mediada por *Agrobacterium*.

Experimento	Variedad	Línea	g de callo	Plásmidos
1	Tempranillo	7	2	pGreenII179-VvFT
				pGreenII179-Vvgai
2	Tempranillo	7	1	pGreenII179-VvFT
				pGreenII179-Vvgai
3	Albariño	47	2	pGreenII179-VvFT
				pGreenII179-Vvgai
4	Albariño	47	1	pGreenII179-VvFT
				pGreenII179-Vvgai
5	Albariño	9	0,7	pGreenII179-VvFT
				pGreenII179-Vvgai
				pGreenII179-VvFT

6	Albariño	26	0,7	pGreenII179-Vvgai
				pGreenII179-VvFT
7	Albariño	9	1	pGreenII179-Vvgai
				pGreenII179-VvFT
8	Albariño	47	1	pGreenII179-Vvgai
				pGreenII179-VvFT
9	Albariño	9	1	pGreenII179-Vvgai
				pGreenII179-VvFT
10	Albariño	23	1	pGreenII179-Vvgai
				pGreenII179-VvFT
11	Albariño	26	1	pGreenII179-Vvgai
				pGreenII179-VvFT
12	Albariño	47	2	pGreenII179-Vvgai
				pGreenII179-VvFT
13	Albariño	26	1	pGreenII179-Vvgai
				pGreenII179-VvFT
14	Albariño	23	1	pGreenII179-Vvgai

### 5.3.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS PLANTAS REGENERADAS: INSERCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS TRANSGENES

Para comprobar si las plantas seleccionadas en los medios de cultivo con antibióticos han integrado el gen o no, se realizó una PCR previa extracción de ADN con el kit de Extracción de ADN plantas (Qiagen DNeasy® Plant Mini kit). Se utilizó el kit de PCR Phyre Direct Plant PCR (ThermoFisher®) utilizando los siguientes cebadores:

Para el gen *Vvgai*, se utilizó como cebador directo 5'-AACATGGTGGAGCACGACAC-3' que se ancla en el promotor y como reverso el 5'-CCGCCGACAGCACCCTCTCA-3' que se ancla en el gen. Para el *VvFT* se utilizaron como cebador directo en el gen 5'-ATTCCAGCAACTACTGGGGC-3' y como reverso el 5'-GCGCTTCTGCGGGCGATTG-3' anclado en el gen de resistencia a la higromicina

Se utilizaron estos cebadores para poder amplificar los fragmentos de los genes insertados mediante los plásmidos y poder diferenciarse de los de la propia planta. El programa utilizado para la PCR figura en el Anexo 1.3.2 con una temperatura de hibridación de 68 °C. Se separaron los fragmentos obtenidos en un gel de agarosa al 1% utilizando como marcador de peso el GeneRuler 1kb. Como control positivo de la transformación se utilizó el plásmido control (179+*VvFT* o 179+*Vvgai* según el caso) a una concentración de 100 ng $\mu$ L<sup>-1</sup> y como controles negativos se utilizó ADN de una planta de vid sin transformar (Albariño 47) y agua (únicamente la master mix, sin ADN). El gel se tiñó con GelRed.

#### 5.3.5.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Con el objetivo de comprobar si existe expresión de los genes de interés introducidos, se realizó esta prueba a las plantas transformadas que fueron positivas para la PCR y a un control negativo. Para ello, se extrajo una muestra de hoja de entre 50 y 100 mg de cada planta para poder realizar la extracción de ARN. Esta muestra se colocó en un tubo Eppendorf con dos bolas de metal estériles y se utilizaron los métodos de extracción de TRIzol® (ThermoFisher®), el kit RNeasy de Qiagen®, y por el método del CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Gambino *et al.* 2015).

Una vez obtenido el ARN se cuantificó mediante Nanodrop y se realizaron RT-PCR. Para ello se utilizó el kit SuperScript II Reverse Transcriptase de Invitrogen. En un primer paso, se puso en un tubo entre 5 y 7  $\mu$ g de ARN. Después se añadió 0,5  $\mu$ L del oligo

Dt o del oligo específico (a una concentración de 100 µM) y el agua estéril necesaria para llegar a 10,5 µL de volumen para cada muestra. Seguidamente, se incubó a 70°C durante 10 minutos y después se puso en hielo.

En una segunda parte, al mix anterior se añadió 4 µL de 5xFirstStand buffer, 2 µL de DTT (un antioxidante), 2 µL de dNTPs (10 µM), 0,5 µL de HPRI (inhibidor) y 1 µL de la RT Superscript (la RT polimerasa). El volumen final para cada muestra fue de 20 µL. Este mix se incubó a 42°C durante 1 hora y después a 70 °C durante 10 minutos. Después de realizar estos pasos, se obtuvo ADNc que se utilizó en un último paso que es la PCR con cebadores específicos para detectar los genes de interés. Este paso se realizó tres veces, con todas la muestras obtenidas con los diferentes métodos, para poder comprobar que método de extracción permitía una mejor amplificación de los genes.

#### 5.3.5.2 SECUENCIACIÓN DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS CON EL GEN *VvGAI*.

Con el fin de poder comprobar la transformación de las plantas que fueron positivas por PCR, se mandaron a secuenciar un total de 13 plantas (plantas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 42). Para ello, en un primer lugar, se realizó una PCR a las extracciones de ADN de cada planta, utilizando como cebadores: (5'-TCATCACCCAACTTGCTCCA-3') como directo, y como reverso (5'-TCCTGTTTTGGTTGGGTGCT-3'). Estos cebadores generan un fragmento de 363 pb en donde está contenida la mutación del gen *Vvgai*.

Tras la PCR, se purificó el producto de PCR utilizando el kit GENECLAN® Turbo kit de MPbio®. El ADN obtenido se eluyó con agua Milli-Q. Los productos de PCR se enviaron al Servicio de Secuenciación del IBMCP, en la Universidad Politécnica de Valencia. El oligo utilizado para la secuenciación fue el reverso, ya que la mutación está muy cerca del principio del gen, y su posición aparece dentro del error del aparato de secuenciación si se utiliza el directo.

#### 5.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS.

En plantas transformadas con el gen *VvFT*, se pudo observar la floración *in vitro* durante el crecimiento en cámara en algunos casos.

Para las plantas transformadas con *Vvgai*, se midió el tamaño de las plantas *in vitro* tras 45 días del subcultivo. La medida se tomó desde la base hasta el ápice de la planta para cada uno de los clones de las distintas líneas transformadas. Como controles, se tomaron medidas de 'Tempranillo', 'Albariño' sin transformar y el mutante PM 179 ('Pinot Menier' 179 cedido por el Dr. Laurent Torregrosa).

Posteriormente se aclimataron entre 2 y 3 plantas de cada genotipo en el invernadero para observar su crecimiento. Durante el tiempo de crecimiento se observó si se producía la floración cada 15 días. A los 8 meses, en el caso de las plantas *Vvgai*, se midió la altura total de la planta, el número de nudos y la longitud de estos.





## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La transformación genética que ofrece la posibilidad introducir genes en un genoma receptor mediante diferentes métodos, se considera una herramienta muy útil para la mejora vegetal y para el estudio de la función génica. En los protocolos que se utilizan mayoritariamente, la transformación mediada por *Agrobacterium* y la biolística, es necesario disponer de procesos de regeneración eficientes que permitan la obtención de plantas a partir de las células transformadas. En este trabajo se han comparado ambas metodologías y estudiado diferentes factores con el fin de disponer de una metodología para la transformación de las variedades de *vid*, ‘Tempranillo’ y ‘Albariño’ de gran importancia en distintas DOPs, a la vez que introducir los genes de floración temprana *VvFT* y *Vvgai*. En primer lugar se han evaluado distintas condiciones para la obtención de callos embriogénicos necesarios para obtener líneas celulares con las que llevar a cabo los ensayos de transformación ya que en *vid*, la embriogénesis somática es la vía morfogénica más común (Saporta *et al.* 2016). También se han evaluado distintos factores que influyen en el proceso de transformación mediante biolística y la infección mediada por *Agrobacterium* para lo que se ha desarrollado previamente la construcción de los plásmidos adecuados portadores de los genes de interés.

### 6.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS

#### 6.1.1 OBTENCIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL EXPLANTE DE PARTIDA Y DEL MEDIO DE CULTIVO

El desarrollo de protocolos para la obtención de callos embriogénicos o suspensiones celulares a partir de éstos es necesario antes de abordar los ensayos de transformación. Este tipo de explantes es comúnmente utilizado en ensayos de transformación de *vid* (Nakano *et al.* 1994; Franks *et al.* 1998, Iocco *et al.* 2001, Agüero *et al.* 2005, Gambino *et al.* 2005, Fan *et al.* 2008, López-Perez *et al.* 2008, Nirala *et al.* 2010; Dai *et al.* 2015) y es bien conocida la influencia del genotipo en la respuesta a la regeneración (Gray *et al.* 2014) pero también, otros factores importantes a tener en cuenta son el material de partida y el medio de cultivo (Prado *et al.* 2010; Vidal *et al.* 2009; Gray *et al.* 2014). En este trabajo se han comparado 2 tipos de explantes (anteras y ovarios) en 3 estadios de desarrollo (II, III y IV) que se han obtenido a partir de flores de plantas de las variedades ‘Tempranillo’ y ‘Albariño’ de dos procedencias (estaquillas de germinador y campo) y se han cultivado en dos medios de cultivo (MSE y el NNE) utilizados previamente por Vidal *et al.* (2009) para estas y otras variedades.

La desinfección del material de partida siguiendo el método de Kikkert *et al.* (2005) fue exitosa no observándose contaminación en ningún explante de un total de 6900 anteras y 2700 ovarios. Sin embargo, no todos los explantes se desarrollaron adecuadamente, observándose necrosis en algunos. Los resultados promedios de porcentaje de necrosis, formación de callo (callogénesis) y embriogénesis tras 6 meses de cultivo se muestran en la Tabla 13 y los resultados para cada tratamiento se muestran en el Anexo 4.

Se observó necrosis en ambos tipos de explantes con una mayor incidencia en anteras (mayoritariamente en estadio II de desarrollo) y en el cultivar ‘Tempranillo’. En promedio, resultaron necrosadas un 69,52% de las anteras cultivadas con un 52,25% en aquellas en estadio II. La inducción de la embriogénesis ocurrió en ambos tipos de

explante (Figura 20), con un mayor porcentaje en ovarios (5,69% vs. 2,18% en anteras). Los porcentajes más altos se obtuvieron en ovarios del estadio III y en anteras de estadio IV del cv. ‘Albariño’ (26,88% y 7,11%, respectivamente) y 8,13 % de los ovarios y 0,5% de las anteras (ambos órganos en estadio III) para el cv. ‘Tempranillo’ (ver Anexo 4). Este resultado confirma el obtenido anteriormente por Vidal *et al.* (2009) en el que los porcentajes de embriogénesis máximos también se obtuvieron en ovarios para ambos cultivares. También, Prado *et al.* (2010), consiguieron en el cv. ‘Albariño’ mayores eficiencias en ovarios respecto de las anteras (25% y 4,67%, respectivamente). Por lo tanto, se pueden seleccionar los ovarios como explante de partida en futuros ensayos.

Tabla 13: Datos promedio de necrosis, formación de callo y embriogénesis de los distintos tratamientos. Valores estadísticos del ANOVA. <sup>1,2</sup> Representan una diferencia estadística con  $P < 0,1$ ;

<sup>a,b</sup> Diferencia con  $P < 0,05$ . Datos sin letra o número  $P > 0,1$ . Datos: promedios de diferentes ensayos de inducción de embriogénesis (Anexo 4)

		% Explantes Necróticos	% Formación de callos	% Embriogénesis
Variedad	Albariño	35,25±3,03 <sup>2</sup>	65,02±3,03 <sup>1</sup>	6,22±0,75 <sup>a</sup>
	Tempranillo	43,33±3,03 <sup>1</sup>	56,67±3,03 <sup>2</sup>	1,65±0,75 <sup>b</sup>
Procedencia estaquillas	Campo	39,92±3,03	60,74±3,03	2,27±0,75 <sup>b</sup>
	Germinador	39,93±3,03	60,95±3,03	5,60±0,75 <sup>a</sup>
Medio de cultivo	MSE	38,41±3,03	61,86±3,03	4,72±0,75
	NNE	40,17±3,03	59,83±3,03	3,15±0,75
Órgano	Ovario	9,06±3,03 <sup>b</sup>	90,94±3,03 <sup>a</sup>	5,69±0,75 <sup>a</sup>
	Antera	69,52±3,03 <sup>a</sup>	30,76±3,03 <sup>b</sup>	2,18±0,75 <sup>b</sup>
Estadio del órgano	II	52,25±3,72 <sup>a</sup>	48,17±3,72 <sup>b</sup>	2,65±0,92
	III	34,61±3,72 <sup>b</sup>	65,39±3,72 <sup>a</sup>	4,48±0,92
	IV	31,02±3,72 <sup>b</sup>	68,98±3,72 <sup>a</sup>	4,32±0,92

Los medios de cultivo MSE y NNE mostraron en promedio resultados equivalentes en cuanto a la producción de callo (60% aproximadamente) y callo embriogénico (3-4%). El medio MSE fue el utilizado por Cutanda *et al.* (2008) y Vidal *et al.* (2009) obteniendo porcentajes máximos de embriogénesis de 1,3%, y 3,94%, respectivamente. En esta tesis, estos los porcentajes fueron superiores, con un promedio del 4,72% y con un máximo para el cv. ‘Tempranillo’ de 8,13% y de 26,88% para el cv. ‘Albariño’ (Anexo 4). Menor respuesta se ha obtenido en este trabajo en el medio NNE (con un promedio de 3,15% de explantes embriogénicos) respecto a los publicados en Vidal *et al.* (2009).

Al comparar anteras y ovarios de distintos estadios de desarrollo, el estadio II resultó ser el menos adecuado al observarse mayor porcentaje de explantes con necrosis (52,25%) respecto a los obtenidos en fase III y IV (34,61% y 31,02% respectivamente). En estos dos últimos estadios el porcentaje de generación de callos embriogénicos fue superior, en promedio 4,48% (estadio III) y 4,32% (estadio IV) frente a 2,65% del estadio II. Este resultado es contrario al obtenido por Vidal *et al.* (2009) donde obtuvieron una mejor respuesta embriogénica en anteras en estadio II para ambos cultivares (0,52% en ‘Tempranillo’ y 2,35% en ‘Albariño’). En ovarios, el estadio III resultó más adecuado para el cv. ‘Tempranillo’ (7,15%) y el IV para el cv. ‘Albariño’ (16,30%). Lo que coincidiría con los resultados de Prado *et al.* (2010) para el cv. ‘Albariño’ (con una respuesta en 4,67% de anteras y 25% de ovarios). Estos resultados indicarían que las flores del cultivar ‘Albariño’ mantienen la capacidad de embriogénesis somática durante un periodo muy



amplio (manteniéndose desde el estadio II al IV) y explicaría su mayor capacidad de respuesta frente a la variedad ‘Tempranillo’ (6,22% vs 1,65%).

La procedencia de los explantes también es un factor a tener en cuenta en la generación de callos embriogénicos. Se consiguió el doble de eficiencia en flores que provenían del germinador (promedio de 5,6%) que de flores que provenían del campo (promedio de 2,27%). Esto podría explicarse por un mejor control sanitario de las primeras.

En resumen, los porcentajes obtenidos para ambas variedades no son especialmente elevados aunque sí son del orden o superiores a los descritos en otros trabajos (Cutanda *et al.* 2008; Vidal *et al.* 2009; Prado *et al.* 2010).

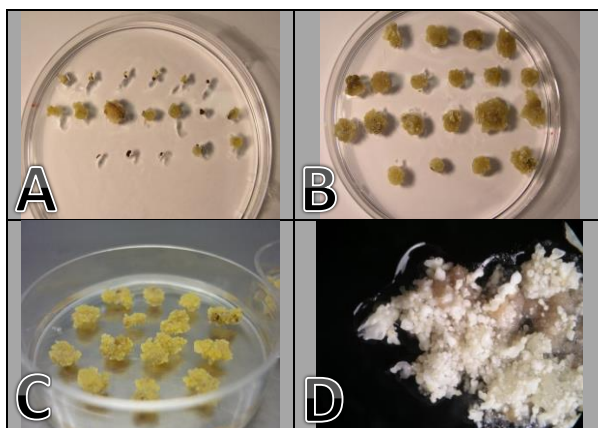


Figura 20: Embriogénesis somática a partir de anteras del cv. ‘Albariño’. A: Explantes de anteras en medio NNE con algunos callos. B: Callos formados en los explantes a los 6 meses de cultivo en medio NNE. C: Callos embriogénicos a los 8 meses de cultivo en medio C<sup>1</sup>P. D: Embriones somáticos germinando a partir de callo del cv. ‘Albariño’ en medio MSCA.

#### 6.1.2 OBTENCIÓN DE LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS Y SUSPENSIONES CELULARES: MATERIAL BASE PARA LA TRANSFORMACIÓN

Con el fin de obtener el material vegetal para la realización de los ensayos de transformación se procedió a la obtención de líneas embriogénicas y de suspensiones celulares. Se seleccionaron 45 callos embriogénicos del cv. ‘Albariño’ y 35 del cv. ‘Tempranillo’ que se mantuvieron en los medios de cultivo en los que se originaron (MSE y NNE) durante dos meses y posteriormente se transfirieron al medio de cultivo C<sup>1</sup>P (Torregrosa, 1998), que contiene hidrolizado de caseína (fuente de nitrógeno) y fue descrito por Prado *et al.* (2010) como adecuado para el correcto mantenimiento de la capacidad embriogénica. A partir de cada callo embriogénico se estableció una línea embriogénica (la cual se dividió para conseguir cantidades suficientes de material) que se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de transformación genética con *Agrobacterium*. También se utilizaron para establecer suspensiones celulares según el protocolo descrito por De la Torre *et al.* (2012) con el objetivo de usar este material en los experimentos de transformación mediante biolística.

Se confirmó la germinación de los embriones en el medio GS1CA descrito por (Franks *et al.* 1998) sin observarse germinación precoz, a diferencia de lo descrito en el trabajo de Prado *et al.* (2010). Sin embargo, un porcentaje de embriones (15% aprox.) resultó ser aberrante (Figura 21), lo cual es un problema común en vid. En los trabajos

descritos por Goebel-Tourand *et al.* (1993), Martinelli *et al.* (2001) o López-Pérez *et al.* (2006) también se obtuvieron embriones aberrantes mono-, di- y poli-cotiledonares, con forma de trompeta o coliflor, embriones fusionados, etc. La mayoría de estos embriones no se desarrollan en plantas normales. Este hecho puede representar una limitación en los experimentos de transformación genética si el porcentaje de embriones anómalos es muy grande. En la Figura 21 se muestran embriones en distintas fases de desarrollo y un detalle de embriones anómalos.

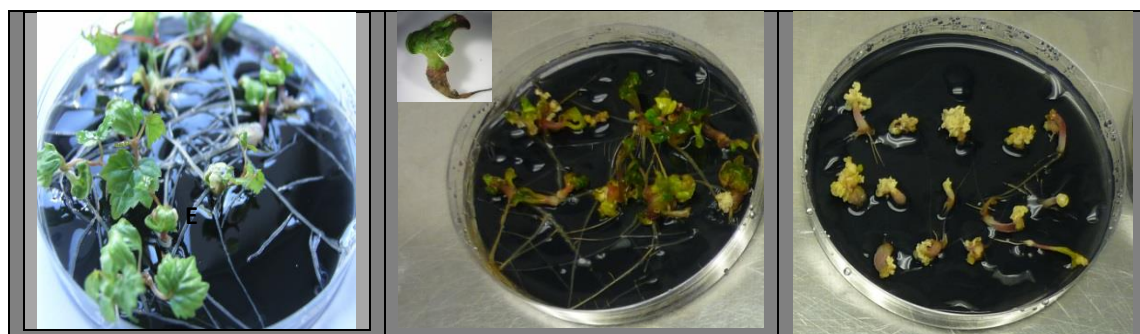


Figura 21: Regeneración de embriones normales del cv. “Tempranillo” (izquierda) VS embriones aberrantes en distintos momentos (centro y derecha). En la imagen central se muestra ampliado embrión aberrante.

Con el fin de observar si un cambio de medio de cultivo disminuiría el porcentaje de embriones aberrantes, se transfirieron embriones de más de 0,5 cm de la línea de ‘Albariño 26’ (que habían mostrado un porcentaje moderado de embriones aberrantes) a dos medios de cultivo, el MS y el WP. El porcentaje de embriones que lograron alcanzar el estadio de planta fue en promedio del 45,45% en el medio MS y del 64% (Tabla 14) en WP.

Tabla 14: Porcentaje de regeneración en planta en dos medios de cultivo (MS y WP) de distintas suspensiones celulares de Albariño 26.<sup>1,2</sup>: ANOVA al P<0,1%.

Medio MS				
Línea embriogénica	Embriones totales	Embriones germinados	Regeneración de planta	% de regeneración en planta
Alb 26.1	13	11	7	53,85
Alb 26.4	10	10	3	30
Alb 26.5	10	10	5	50
Totales	33	31	15	45,45 <sup>2</sup>
Medio WP				
Línea embriogénica	Embriones totales	Embriones germinados	Regeneración de planta	% de regeneración en planta
Alb 26.1	13	11	9	69,23
Alb 26.4	10	10	6	60
Alb 26.5	10	10	6	60
Totales	33	31	21	63,64 <sup>1</sup>

Tras la realización de un ANOVA, no se encontraron diferencias significativas entre los dos medios al 0,05%, pero sí al 0,1%. Así pues, si asumimos la significación al

0,1%, podemos decir que el medio de cultivo WP produjo una mayor conversión de embriones a planta que el medio MS, por lo que se seleccionaron las sales WP para realizar los medios de cultivo. También se comparó la altura de las plantas regeneradas tras un mes en los dos medios, confirmando que el medio WP es más adecuado para el crecimiento del cv. ‘Albariño’ (Figura 22). En el trabajo de Alzubi *et al.* (2012) se comparan estos dos medios con distintos portainjertos y concluye que dependiendo de la variedad es más favorable para el desarrollo uno u el otro. En el de San Pedro *et al.* (2017) se seleccionan como más adecuadas las sales WP frente a las MS con la mitad de macronutrientes y se comprueba la utilidad del medio MW que contiene estas sales para el cultivo de numerosas variedades de vid (San Pedro *et al.* 2018).

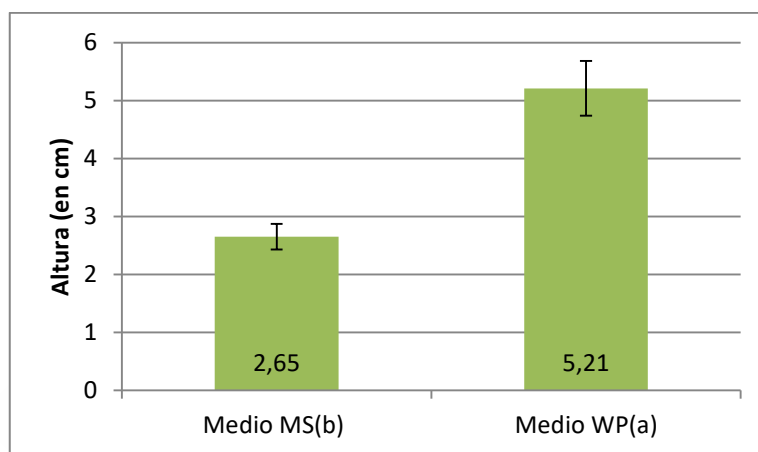


Figura 22: Altura promedio de 10 plantas cultivadas en los medios de cultivo MS y WP. Medidas en cm desde la base hasta el ápice tras 30 días de cultivo.  
a,b: ANOVA con P valor < 0,05%.

## 6.2. PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA DE TRANSFORMACIÓN

Una vez se disponía de líneas embriogénicas, se llevaron a cabo distintos ensayos con el fin de adecuar una metodología eficiente de transformación utilizando un plásmido con un gen marcador que facilitara el seguimiento de los eventos de transformación. Se utilizó el protocolo original de Kikkert *et al.* (2004) de transformación mediante biolística, utilizando el plásmido PBI426 que contiene el gen *uidA* que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa, la cual en contacto con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc), genera un precipitado de color azul (tinción gus) y nos permite determinar que células expresan el gen y, por lo tanto, están transformadas. Se compararon distintos parámetros que influyen en la transformación: 1) diferentes tipos y tamaños de partícula, 2) velocidades de agitación de las partículas durante el *coating* (adherencia del ADN a las partículas), 3) concentración de antibiótico y 4) la viabilidad de los embriones tras el contacto con el medio de selección.

### 6.2.1 INFLUENCIA DEL TIPO Y TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA

Se compararon tres tipos de partículas (oro, tungsteno y dióxido de titanio) y 2 tamaños de partícula (1 y 0,6 micras) utilizados de manera independiente o combinados,

observándose transformación (puntos azules) únicamente cuando se utilizaron partículas de oro (Tabla 15, Figura 24). Esto pareció interesante pues existe variedad de partículas en el mercado y era necesario saber cual era la más adecuada para el material vegetal que íbamos a utilizar, ya que podía haber diferencias según cultivos.

Aunque el tungsteno ha sido utilizado en la variedad ‘Chancellor’ por Hébert *et al.* (1993) y en el cv. ‘Chardonnay’ por Vidal *et al.* (2003), nuestros resultados apuntan a una posible toxicidad de esta partícula como se comenta en el trabajo de Russell *et al.* (1992) en tabaco. También están en concordancia con los resultados de Vidal *et al.* (2003) que encontraron más eventos de transformación al utilizar oro respecto a tungsteno (1317 vs 860) en la variedad de vid ‘Chardonnay’, aunque en este caso la toxicidad fue claramente menor. Por lo que parece existe distinta susceptibilidad en función del genotipo utilizado. Por otro lado, los proyectiles de dióxido de titanio utilizados con cierto éxito en algas (Hou *et al.* 2013) no resultaron adecuados (no se obtuvieron resultados) para la transformación en la vid pese a ser una partícula que podría ser prometedora ya que puede ser modificable en forma, tamaño y rugosidad (comunicación personal, Dr. Álvaro Gil González del Instituto de Cerámica de la Universidad de Santiago de Compostela).

Tabla 15: Número de eventos de transformación en forma de puntos azules de los distintos tipos de partícula (promedio de tres placas por tratamiento). No existen diferencias en los tratamientos (p-valor >0,5).

	Oro 1 micra	Oro 0,6 micras	Oro 1+0,6 micras	Tungsteno	Dióxido de titanio
Media	7872	7936	3888	0	0
Desvest	4073.8	6848.5	2033.3	0	0
Error	2352.0	3954.0	1173.9	0	0

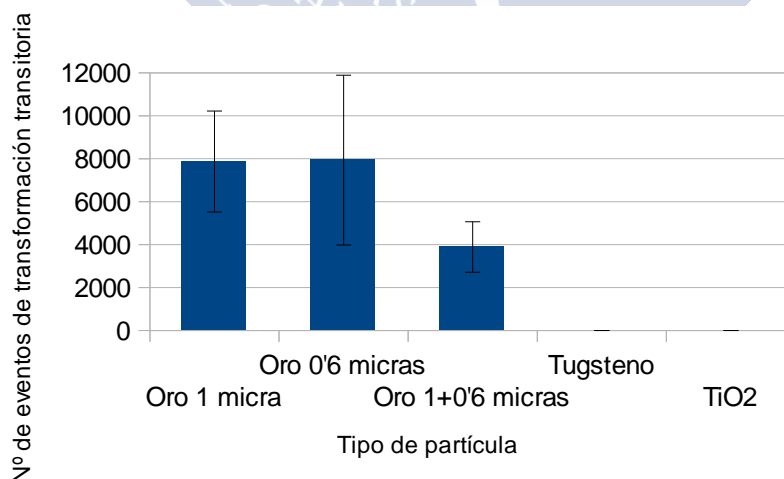


Figura 23: Número de eventos de transformación transitoria de los diferentes tipos y tamaños de partícula.

Las partículas de oro se han utilizado en los trabajos de Scorza *et al.* (1995 y 1996), Franks *et al.* (1998), Vidal *et al.* (2003 y 2006) en distintos tamaños (0,6, 0,75, 1 y 1,6 micras). En nuestro ensayo se compararon partículas de 0,6 y 1 micra y la combinación de ambos tamaños, la cual resultó exitosa en el trabajo de Martín-Ortigosa *et al.* (2010). Se

observó una enorme variabilidad entre placas para cada uno de los tratamientos y los mejores resultados se obtuvieron al utilizar de forma separada las partículas de oro de 1 y de 0,6 micras con 7872 y 7936 eventos de transformación, respectivamente (Tabla 15 y Figura 23). En otros trabajos como el de Frame *et al.* (2000) en maíz, la diferencia obtenida entre el tamaño de partículas es muy superior (con una eficiencia de transformación va desde un 4,6 a 31,4% con partículas de 0,6 micras y entre 0 y 1,9% para las de 1 micra). Debido a que no hubo diferencias en cuanto al tamaño de partícula y las placas eran más homogéneas cuando se utilizaron las partículas de 1 micra, se seleccionaron estas para realizar los siguientes experimentos de biolística. Este tamaño de partícula es la que se usó en el protocolo original de Kikkert *et al.* (2004) y no difiere en el precio con respecto a las de 0,6 micras.

#### 6.2.2 COMPARACIÓN DE VELOCIDADES DE AGITACIÓN DEL ORO EN EL COATING

Se quiso comprobar si hay diferencias significativas entre distintas velocidades utilizadas para agitar el oro durante el *coating* (proceso de adherencia del ADN a las paredes de la partícula) ya que se ha considerado un paso crítico en distintos protocolos (Sandford *et al.* 1993, Kikkert *et al.* 2004, Ueki *et al.* 2008). Cuanto menos apelmazado esté el oro y más homogeneizado esté el ADN entre las partículas durante el *coating*, se obtienen mejores eficiencias de transformación.

De las 3 velocidades de agitación ensayadas (500, 1000 y 2000 rpm), se obtuvo un menor número de células transformadas cuando se realizó la adhesión del ADN a las partículas a menor velocidad (Tabla 16).

Tabla 16: Número de eventos de transformación de los 3 tratamientos (cada uno con 6 placas) con diferente velocidad de agitación. <sup>a, b</sup>: ANOVA al 0'05%.

Velocidades	500 rpm	1000 rpm	2000 rpm
Media	1177.83 <sup>b</sup>	2224.83 <sup>a</sup>	1806.33 <sup>a</sup>
Desvest	475.27	595.08	388.22
Error	194.03	242.94	158.49

Este resultado apoyaría que la velocidad de agitación del oro, para evitar el apelmazado y favorecer la homogeneización, es importante, si no se agita suficientemente el oro, por su peso y densidad, podría quedarse en la parte baja del tubo Eppendorf y el ADN no sería repartido y adherido correctamente en las partículas. Por otra parte, una agitación demasiado vigorosa podría producir que el ADN se despegara de las partículas. En nuestro ensayo se ha determinado que una velocidad a 1000 o 2000 rpm es adecuada y genera una carga génica en las partículas que se traduce en una mayor eficiencia de transformación: entre 1800 y 2200 eventos de transformación frente a los 1200 de la velocidad de 500 rpm (Tabla 16).



### 6.2.3 AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICO PARA LA SELECCIÓN DE PLANTAS TRANSFORMADAS.

La vid es una planta sensible a la acción de los antibióticos, por ello era necesario establecer qué niveles eran adecuados para la selección, de manera que se minimizaran los escapes, pero a su vez permitiera la regeneración del material vegetal.

La selección es un paso crucial para la regeneración de las plantas transformadas de vid y se ha descrito como un cuello de botella para la aplicación de esta biotecnología a *V. vinifera* (Bouquet *et al.* 2008). En muchos estudios, la concentración de antibióticos utilizada varía dentro del rango de 15 y 100 mgL<sup>-1</sup> para el antibiótico kanamicina (Franks *et al.* 1998; Wang *et al.* 2005; Zhijian *et al.* 2008) y entre 3 y 25 mgL<sup>-1</sup> para el antibiótico higromicina (Perl *et al.* 1996; Torregrosa *et al.* 2000) dependiendo del material vegetal utilizado para la transformación (suspensiones celulares o callos embriogénicos). Torregrosa *et al.* (2000) comentan que el mayor problema transformando la vid es el equilibrio entre la selección y el efecto inhibitorio de los antibióticos en el desarrollo del embrión. Este equilibrio se debería probar en un experimento preliminar para cada genotipo, e incluso, para cada línea embriogénica, con el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria que permita la emergencia y el desarrollo de los embriones transgénicos.

En este estudio se ha evaluado el comportamiento de distintas líneas del cv. 'Albariño' y el cv. 'Tempranillo' en el medio MSCA seleccionado como medio para el desarrollo de los embriones al que se adicionaron concentraciones del antibiótico kanamicina (en el rango de 0 a 80 mgL<sup>-1</sup> con intervalos de 10 en 10) o del antibiótico higromicina (concentraciones de 0 a 20 mgL<sup>-1</sup> con intervalos de 2,5) con el fin de determinar aquella concentración más adecuada para efectuar la selección en los ensayos de transformación (Figura 24). Tras 3 meses de cultivo se puede observar que existe una gran diferencia en cuanto a la obtención de embriones por líneas, siendo el cv. 'Tempranillo' línea 1 la más productiva (Anexo 5). Por otra parte, se produce, en general, una inhibición en cuanto a la formación de los embriones cuando el medio contiene el antibiótico kanamicina en concentraciones superiores a 20 mgL<sup>-1</sup>. El cultivar 'Tempranillo' muestra mayor resistencia al antibiótico kanamicina que el cv. 'Albariño'. Este último detiene su desarrollo en una concentración de 50 mgL<sup>-1</sup>, mientras que se recuperan embriones en el cv. 'Tempranillo' en medios que contienen 70 u 80 mgL<sup>-1</sup> del antibiótico kanamicina aunque con muy bajos porcentajes. En cuanto al antibiótico higromicina las dos variedades muestran un comportamiento similar. Concentraciones superiores a 10 mgL<sup>-1</sup> impiden la regeneración (Anexo 5).

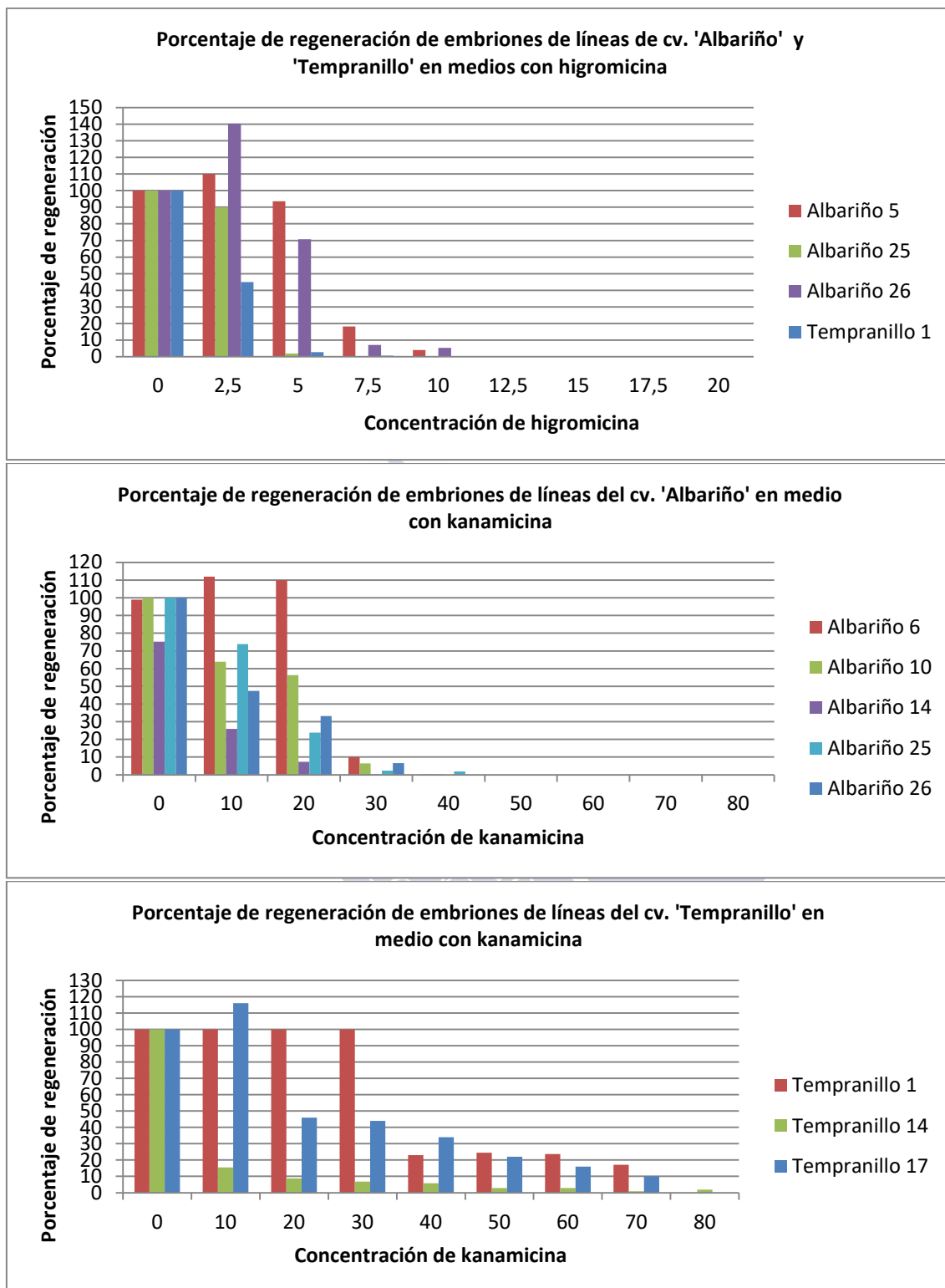


Figura 24: Porcentaje de regeneración de embriones de distintas líneas de los cultivares 'Albariño' y 'Tempranillo' en medio de cultivo con diferentes concentraciones ( $\text{mgL}^{-1}$ ) de antibióticos (kanamicina e higromicina).



En la Figura 25 puede observarse la reducción de embriones del cv. ‘Albariño’ a medida que aumenta la concentración del agente selectivo, en este caso la kanamicina, así como un aumento en el porcentaje de embriones que necrosan.

La línea 25 generó un mayor número de embriones respecto al resto de líneas de ‘Albariño’ utilizadas (Anexo 5), por lo que es esperable obtener un mayor número de embriones en esta línea también en medio selectivo, lo cual ocurre tanto en medios con el antibiótico kanamicina como en medios con el antibiótico higromicina. La mayor emergencia de embriones en la línea 25 comparado con otras líneas puede ser debida a la distinta cantidad de crecimiento de biomasa de las suspensiones celulares (De la Torre *et al.* 2012) así como el tamaño y el estado fisiológico del grano de la suspensión (agregados celulares). Una gran densidad celular en las suspensiones puede producir una inhibición en el desarrollo del embrión en *V. vinífera*, tal y como se refleja en el trabajo de Wang *et al.* (2005). Este fenómeno se ha observado también en nuestro caso, pues se vio que en ocasiones emergen más embriones en concentraciones bajas de antibiótico que en los controles sin antibiótico (Albariño 6 con el antibiótico kanamicina o Albariño 26 con el antibiótico higromicina) esto podría ser debido a efectos por saturación (> n° embriones) y competencia (Figura 25 y Anexo 5).

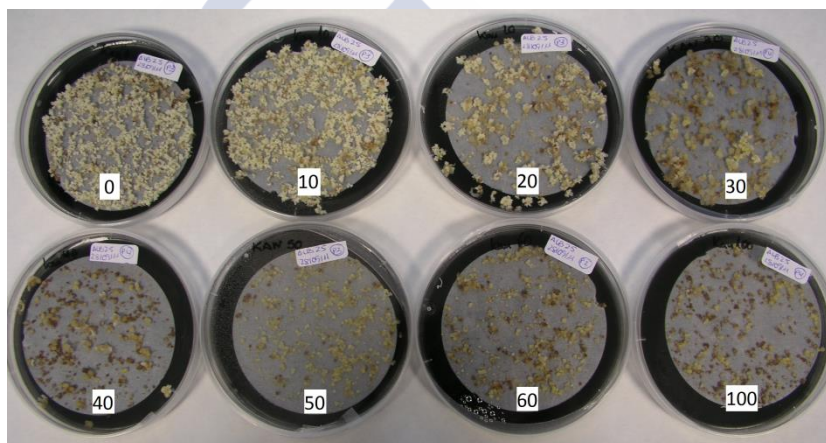


Figura 25: Determinación de la concentración máxima que permite la emergencia de embriones en medio de cultivo con el antibiótico kanamicina (con incrementos de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ ) después de 3 meses de incubación en la línea Albariño 25.

Respecto al antibiótico higromicina, hemos visto que las concentraciones superiores a  $10 \text{ mgL}^{-1}$  son suficientes para inhibir el desarrollo de los embriones. Y se observó necrosis a partir de  $5 \text{ mgL}^{-1}$  (Anexo 5).

Con los resultados obtenidos podemos determinar que para la selección de líneas celulares del cv. ‘Albariño’ concentraciones de entre 30 y  $40 \text{ mgL}^{-1}$  del antibiótico kanamicina y entre 7,5 y  $10 \text{ mgL}^{-1}$  para el antibiótico higromicina podrían resultar óptimas. En este rango se permite la regeneración de plantas no transformadas (escapes) en muy bajo número pero también se favorece que las plantas resistentes se desarrollen mejor. Sin embargo, el antibiótico kanamicina genera una vitrificación amarillenta en la suspensión celular que podría afectar a su transformación en embrión (Figura 26). En el cv. ‘Tempranillo’ el antibiótico kanamicina no parece un buen selector, ya que se requiere de concentraciones elevadas y se observó un mal desarrollo de los embriones en los medios de selección.

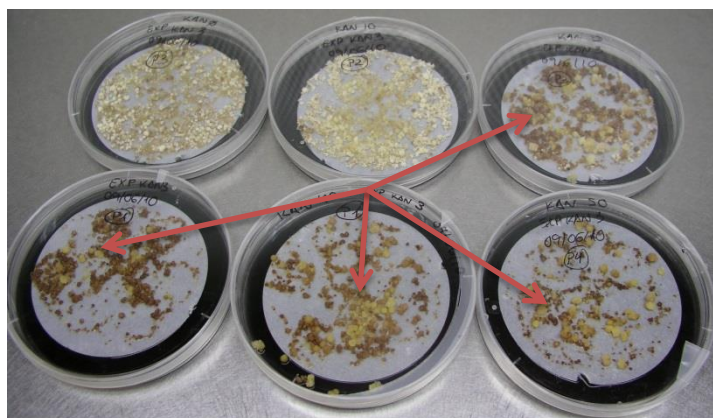


Figura 26: Vitrificación amarillenta del cv. 'Albariño' con distintas concentraciones del antibiótico kanamicina.

Una alta sensibilidad de la vid al antibiótico kanamicina ha sido descrita en Gray y Meredith (1992) y diferentes autores mencionan que es realmente difícil en los cultivos de vid equilibrar la concentración del antibiótico kanamicina que es adecuada para llevar a cabo una correcta selección y a la vez, permita el desarrollo de embriones y plantas (Gray y Meredith 1992, Torregrosa *et al.* 2000, Saporta *et al.* 2014). Esto explica las grandes diferencias que se mencionan en la literatura con respecto a la concentración usada para la selección y el momento en que se aplica. En diferentes trabajos se usa en rangos que van de 10 a 100 mgL<sup>-1</sup> (Nakano *et al.* 1994, Scorza *et al.* 1995 and 1996, Franks *et al.* 1998, Yamamoto *et al.* 2000, Iocco *et al.* 2001, Vidalet *et al.* 2003 and 2006, Agüero *et al.* 2005, Bornhoffet *et al.* 2005, Gambino *et al.* 2005, Wanget *et al.* 2005, Li *et al.* 2006, Dutt *et al.* 2008, López-Pérez *et al.* 2008, Jin *et al.* 2009, Dhekney *et al.* 2011, Gago *et al.* 2011, Dabauza *et al.* 2015, Li *et al.* 2015 y Saporta *et al.* 2016). Por otro lado, el antibiótico higromicina es usado habitualmente en rangos que van de 3 a 25 mgL<sup>-1</sup> (Franks *et al.* 1998, Fan *et al.* 2008, Nirala *et al.* 2010, Nookaraju and Agrawal 2012, Saporta *et al.* 2014 y Dai *et al.* 2015).

Tabla 17: Viabilidad de los embriones de Albariño 26 germinados en los diferentes medios con antibióticos tras un mes en medio de germinación.

Concentración antibióticos (mgL <sup>-1</sup> )	Embriones iniciales			Embriones tras 1 mes			% supervivencia tras 1 mes		
	En MSCA	En WP	Totales	En MSCA	En WP	Totales	En MSCA	En WP	Totales
Kanamicina									
5	14	13	27	8	8	16	57,14	61,54	59,25
10	5	5	10	0	0	0	0	0	0
15	5	5	10	0	0	0	0	0	0
Higromicina									
2	55	55	110	55	45	100	100	81,81	90,91
4	56	61	117	53	52	105	92,86	85,2	89,74
6	25	25	50	6	6	12	24	24	24
8	6	5	11	0	0	0	0	0	0
Controles									
0	46	40	86	40	37	77	86,96	92,5	89,53

En la Tabla 17, se muestra la supervivencia de los embriones germinados en dos medios de selección con antibióticos. Para ello se utilizaron embriones cultivados en medios con las distintas concentraciones de antibiótico (0, 10 y 15 de kanamicina y 2, 4, 6

y 8 de higromicina) de un experimento de selección con la línea 26 del cv. ‘Albariño’. Tras un 1 mes en el medio de cultivo con el agente de selección se subcultivaron a medio de cultivo sin antibiótico y se contabilizó el número de embriones en desarrollo al mes de cultivo en condiciones no selectivas.

Como se observa en la tabla esta línea del cultivar ‘Albariño’ es sensible al antibiótico kanamicina puesto que solo sobreviven el 59% de los embriones seleccionados en el medio de cultivo con la menor concentración de antibiótico ensayada ( $5 \text{ mgL}^{-1}$ ). También es indicativo este dato de la importancia de ajustar muy bien la concentración de selección no solo basándonos en supervivencia sino en el desarrollo. De los embriones presentes en medios con  $10$  o  $15 \text{ mgL}^{-1}$  del antibiótico kanamicina, ninguno se desarrolló. Para este cultivar parece más óptima la selección con el antibiótico higromicina, donde se obtuvieron resultados de regeneración muy superiores (Tabla 17). A medida que aumenta la concentración del antibiótico higromicina en el medio la capacidad de recuperación, como es esperable, es menor. El hecho de que a  $6 \text{ mgL}^{-1}$  se recuperara un 24 % de los embriones parece indicar que es una buena concentración que equilibra selección-regeneración. A menor concentración es esperable mayor número de escapes pero si la dosis es demasiado alta no se recuperan plantas.

### 6.3. ELABORACIÓN DE PLÁSMIDOS Y EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACIÓN PARA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *VvFT* Y *VvGAI*.

#### 6.3.1 OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DE PLÁSMIDOS PORTADORES DE LOS GENES *VvFT* Y *VvGAI* A UTILIZAR EN LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACIÓN.

Con el fin de realizar los ensayos de transformación para evaluar la expresión de los genes *VvFT* y *VvGai* se consideró de interés la elaboración de plásmidos de pequeño tamaño que se han descrito como vectores eficientes para ensayos de transformación genética (Sambrook *et al.* 1989).

Tal como se describe en material y métodos se han utilizado los plásmidos pGreen 29 y 179 (Hellens *et al.* 2000; Watson *et al.* 2016) portadores de los genes de selección *nptII* y *hptI* respectivamente, para introducir los genes de floración *VvFT* y el *VvGai*. Ambos genes bajo el control de un doble promotor 35S y un terminador CaMV (Figura 27) que provienen del plásmido pJIT60. En estos plásmidos, no fue introducido el gen marcador GUS, porque haría que el plásmido fuera demasiado grande.

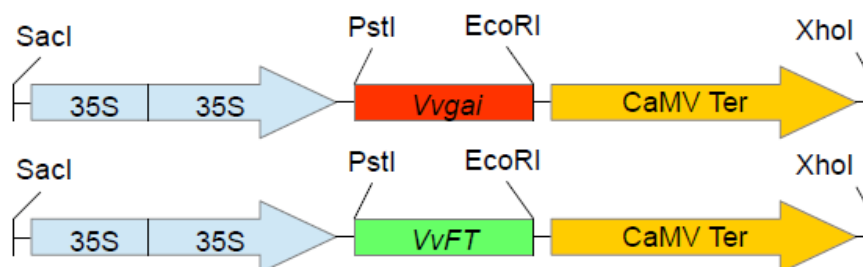


Figura 27: Representación esquemática de los casetes obtenidos del plásmido pJIT60 con los genes de floración.

Tabla 18: Tamaños de los plásmidos y las construcciones realizadas en pares de bases.

Plásmido	Zona	Pb
pJit60	Promotor 35x2	760
	Polilinker	60
	Terminador 35S	740
	Esqueleto	2180
	Casete	1560
	Total	3740
pGreenII 179	Esqueleto	2495
	Casete	2649
	Total	5144
pGreenI 29	Total	4632
<b>Construcciones</b>		
	Vvgai	1773
	VvFT	525
	Casete pJit60 + Vvgai	3276
	Casete pJit60 + VvFT	2025
	pJit 60 + Vvgai	5513
	pJit 60 + VvFT	4265
	pGreenII 179 + Vvgai	8417
	pGreenII 179 + VvFT	5669
	pGreenI 29 + Vvgai	7905
	pGreenI 29 + VvFT	5157

Las construcciones obtenidas (Tabla 18) se comprobaron por secuenciación de los genes de floración y realizando digestiones con enzimas de restricción que cortan en distintos puntos del plásmido obteniendo bandas del tamaño esperado en cada uno de los casos.

Tabla 19: Tamaños teóricos (en pares de bases) de los fragmentos producidos de los plásmidos contruidos con las digestiones simples y dobles.

Construcción	EcoRI	XhoI	PstI	SacI	SacI+XhoI	EcoRI+PstI	EcoRI+SacI
pJit 60 + Vvgai	5513	5513	5513	5513	3333+2180	1773+3740	2533+2960
pJit 60 + VvFT	4265	4265	4265	4265	2025+2240	525+3740	1285+2980
pGreenII 179 + Vvgai	8417	8417	8417	8417	3333+5084	1773+5144	2533+5884
pGreenII 179 + VvFT	5669	5669	5669	5669	2025+3644	525+5144	1285+4384
pGreenI 29 + Vvgai	7905	7905	7905	7905	3333+4572	1773+4632	2533+5372
pGreenI 29 + VvFT	5157	5157	5157	5157	2025+3132	525+4632	1285+3872

Las digestiones se realizaron con los enzimas *EcoRI*, *XhoI*, *PstI* y *SacI*, que cortan en ambos plásmidos en un punto y abren el mismo linearizándolo y obteniendo un fragmento. Con las combinaciones *SacI+XhoI*, *EcoRI+PstI* y *EcoRI+SacI*, que cortan los plásmidos por dos sitios, se generaron diferentes fragmentos (Tabla 19 y Figura 28). Puede observarse que cuando se corta con *EcoRI* aparecen unas bandas adicionales (marcadas en la figura) que se asocian, tras revisar los mapas de restricción, a la actividad *star* del enzima, pues se probó con enzimas de diferentes casas comerciales, arrojando el mismo resultado (cortes inespecíficos). En la Tabla 19 puede verse el tamaño de los diferentes fragmentos generados tras las digestiones de las distintas construcciones con los enzimas de restricción.



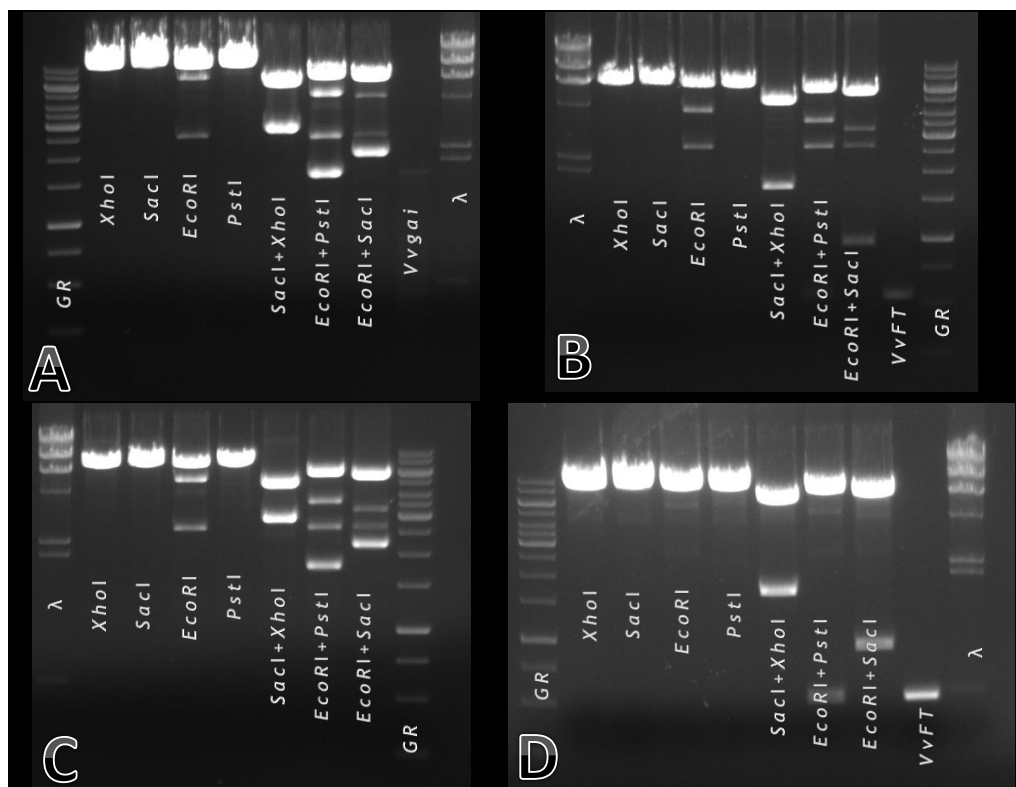


Figura 28: Visualización de los productos de PCR con las digestiones enzimáticas. A: pGreenII 179+Vvgai; B: pGreenII 179+VvFT; C: pGreenI 29+Vvgai; D: pGreenI 29+VvFT. En los geles están representadas las digestiones de izquierda a derecha: *XhoI*, *SacI*, *EcoRI*, *PstI*, *SacI*+*XhoI*, *EcoRI*+*PstI* y *EcoRI*+*SacI*. Los marcadores de peso utilizados fueron el GeneRuler 1Kb (GR) y el  $\lambda$ HindIII ( $\lambda$ ).

También se secuenciaron los genes de interés con el fin de comprobar que se hubieran insertado correctamente en los plásmidos. En la siguiente figura (Figura 29) se muestra la secuencia del gen *VvFT* comparado mediante *Blast* con la secuencia publicada (Carmona *et al.* 2007). La comparativa del gen *Vvgai* con la secuencia publicada por Boss y Thomas (2002) se muestra en el Anexo 6. La coincidencia obtenida fue de más de un 97% (Debido a fallos de secuenciación y a mutaciones sinónimas en el caso del *Vvgai*)

```

Query 67  GCGTTGTCGGGGATGTTCTGGACCCCTTTCTCAGSTCCATCACTCTGAGGGTGACCTACA 126
Sbjct 23  GCGTTGTCGGGGA-GTTCGGACCCCTTTCTCAGSTCCATCACTCTGAGGGTGACCTACA 81

Query 127 ATATAGAGAAGTAGCAATGGCTGTGAGTTCAGACCCCTCTCAGCTAGTCAGCCAACTA 186
Sbjct 82  ATATAGAGAAGTAGCAATGGCTGTGAGTTCAGACCCCTCTCAGCTAGTCAGCCAACTA 141

Query 187 GGGTGGACATTGGAGGGGATGACTTGAGGACCTTCTATACCTTTGGTTATGGTGGACCTG 246
Sbjct 142 GGGTGGACATTGGAGGGGATGACTTGAGGACCTTCTATACCTTTGGTTATGGTGGACCTG 201

Query 247 ACGCTCCAAGCCCCAGTAATCCGAACCTAAGGGAGTACTTACATTGGTTGGTGACTGATA 306
Sbjct 202 ACGCTCCAAGCCCCAGTAATCCGAACCTAAGGGAGTACTTACATTGGTTGGTGACTGATA 261

Query 307 TTCCAGCAACTACTGGGGCAAACCTCGGCCAAGAGATTGTGTGTTATGAGAGCCACGCC 366
Sbjct 262 TTCCAGCAACTACTGGGGCAAACCTCGGCCAAGAGATTGTGTGTTATGAGAGCCACGCC 321

Query 367 CAACAGCTGGGATTCATCGCTTTGTTTTGTATTGTTTCGCCAAGTGGGTAGGCAGACAG 426
Sbjct 322 CAACAGCTGGGATTCATCGCTTTGTTTTGTATTGTTTCGCCAAGTGGGTAGGCAGACAG 381

Query 427 TGTATGCACCAAGGTGGGCGCAAAATTTCACTAGGGACTTTGCTGAGCTTTATAATC 486
Sbjct 382 TGTATGCACCAAGGTGGGCGCAAAATTTCACTAGGGACTTTGCTGAGCTTTATAATC 441

Query 487 TTGGTTTGGCTGTGCTGCTGTTTATTTAACTGCCAAGGAGGGCGGCTCGGGTGGTC 546
Sbjct 442 TTGGTTTGGCTGTGCTGCTGTTTATTTAACTGCCAAGGAGGGCGGCTCGGGTGGTC 501

Query 547 GAAGATCATAA 557
Sbjct 502 GAAGATCATAA 512

```

Figura 29: Comparativa de secuencias entre el *VvFT* de los plásmidos construidos (Sbjct) y la accesión de *VvFT* DQ871590 (NCBI) (Query).

Los plásmidos obtenidos (Figuras 30 y 31) se introdujeron por choque térmico en *E. coli* (DH5 $\alpha$ ). Las bacterias transformadas se crioconservaron utilizando glicerol y a -80°C. Posteriormente se extrajeron los plásmidos de *E. coli* y se introdujeron mediante electroporación en la cepa de *A. tumefaciens* (EHA105) para llevar a cabo los ensayos de transformación mediada por la bacteria.

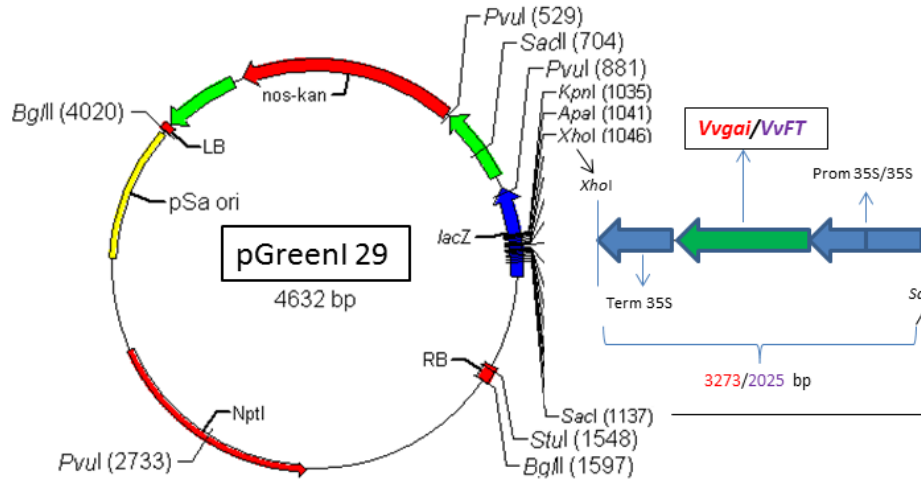


Figura 30: Representación esquemática del plásmido pGreenI 29 con los genes de floración.

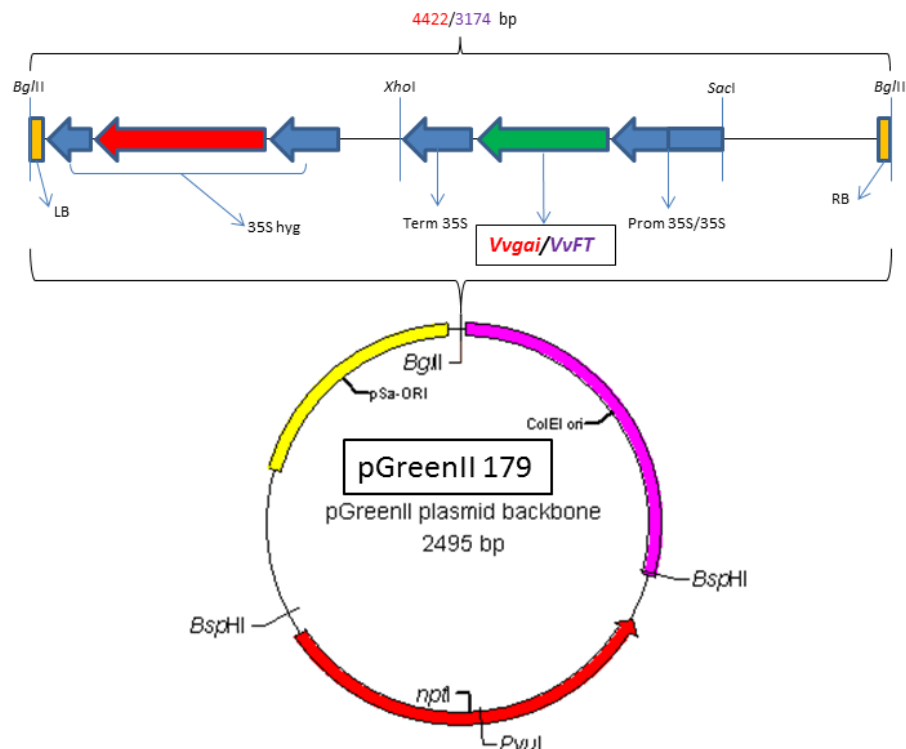


Figura 31: Representación esquemática del plásmido pGreenII 179 con los genes de floración.

### 6.3.2 TRANSFORMACIÓN MEDIANTE BIOLÍSTICA DE SUSPENSIONES CELULARES PARA INTRODUCIR LOS GENES *VvFT* Y *Vvgai* EN LOS CULTIVARES ‘ALBARIÑO Y ‘TEMPRANILLO’.

Se realizaron un total de 33 experimentos de transformación entre los años 2011 y 2013, utilizando los plásmidos obtenidos (pGreen29+*VvFT*, pGreen29+*Vvgai*, pGreen179+*VvFT* y pGreen179+*Vvgai*). En cada uno de los ensayos se realizó también la transformación con el plásmido pBI426, que contiene el gen chivato de la  $\beta$ -glucoronidasa (*uidA*-Gus) (el conteo de eventos de transformación como puntos azules en esta transformación nos da una estimación de si se ha producido algún error en el proceso de transformación y nos sirve como control), ya que los plásmidos que contienen los genes de interés no lo llevan para evitar que fueran demasiado grandes. Se siguió el protocolo de Kikkert *et al.* (2004) con algunas variantes derivadas de los experimentos previos de optimización (agitación a 1000 rpm y partículas de oro 1 micra).

En la siguiente tabla se especifican los ensayos realizados, el rendimiento obtenido en la transformación utilizada como control, y el número de embriones y plantas regeneradas en cada ensayo.

Tabla 20: Experimentos de biolística realizados y resultados obtenidos

Experimento	Año	Variedad	Línea	Plásmidos	Placas	Nº Puntos azules (eficiencia)	Embriones	Plantas
1	2011	Albariño	25	pGreenI29- <i>Vvgai</i>	12	755	0	0
2	2011	Albariño	25-2	pGreenII179- <i>Vvgai</i>	12	1627	0	0
4	2011	Albariño	25-3-2	pGreenII179- <i>Vvgai</i>	6	2012	5	0
6	2012	Albariño	25-2	pGreenII179- <i>Vvgai</i>	6	2652	17	1
7	2012	Albariño	25-4-1	pGreenII179- <i>Vvgai</i>	5	914	13	0
8	2012	Albariño	25-4	pGreenII179- <i>Vvgai</i>	6	2377	5	0
				pGreenII179- <i>VvFT</i>	6		1	0
15	2012	Albariño	25-1	pGreenI29- <i>VvFT</i>	6	5015	0	0
				pGreenII179- <i>VvFT</i>	6		0	0
				pGreenI29- <i>Vvgai</i>	6		26	0
				pGreenII179- <i>Vvgai</i>	6		0	0
16	2012	Albariño	25	pGreenI29- <i>VvFT</i>	6	16293	14	1
				pGreenII179- <i>VvFT</i>	6		17	2
				pGreenI29- <i>Vvgai</i>	6		22	1
				pGreenII179- <i>Vvgai</i>	6		24	3
19	2012	Albariño	25-2	pGreenI29- <i>VvFT</i>	6	12005	18	0
				pGreenII179- <i>VvFT</i>	6		10	0
				pGreenI29- <i>Vvgai</i>	6		29	0
				pGreenII179- <i>Vvgai</i>	6		9	0
21	2012	Albariño	22-1	pGreenII179- <i>VvFT</i>	6	13520	0	0



				pGreenII179-Vvgai	6		17	0
25	2013	Albariño	22	pGreenII179-VvFT	6	3584	6	1
				pGreenII179-Vvgai	6		1	0
27	2013	Albariño	22-3	pGreenI29-VvFT	6	4106	0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
29	2013	Albariño	22-2	pGreenII179-VvFT	3	7872	0	0
				pGreenI29-VvFT	6		0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
30	2013	Albariño	22	pGreenI29-VvFT	6	874	0	0
				pGreenII179-VvFT	6		0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
				pGreenII179-Vvgai	6		0	0
32	2013	Albariño	22-1	pGreenI29-VvFT	6	5532	1	0
				pGreenII179-VvFT	6		2	0
				pGreenI29-Vvgai	6		2	0
				pGreenII179-Vvgai	6		1	0
33	2013	Albariño	22	pGreenI29-VvFT	6	3274	1	0
				pGreenII179-VvFT	6		2	0
				pGreenI29-Vvgai	6		1	0
				pGreenII179-Vvgai	6		3	1
12	2012	Albariño	18-1	pGreenI29-VvFT	6	114	0	0
				pGreenII179-VvFT	6		0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
				pGreenII179-Vvgai	6		0	0
13	2012	Albariño	18-2	pGreenI29-VvFT	3		0	0
				pGreenII179-VvFT	5		0	0
				pGreenI29-Vvgai	3		0	0
				pGreenII179-Vvgai	3		0	0
26	2013	Albariño	18-1	pGreenI29-VvFT	6	2212	19	1
				pGreenII179-VvFT	6		22	2
				pGreenI29-Vvgai	6		13	1
				pGreenII179-Vvgai	6		13	1
28	2013	Albariño	18	pGreenII179-VvFT	6	4298	0	0
				pGreenII179-Vvgai	6		0	0
14	2012	Albariño	3-2	pGreenI29-Vvgai	6	711	0	0
				pGreenII179-	6		27	11

				Vvgai				
18	2012	Albariño	3-2-1	pGreenI29-VvFT	6	23829	0	0
				pGreenII179-VvFT	6		3	2
				pGreenI29-Vvgai	6		2	0
				pGreenII179-Vvgai	6		7	2
22	2012	Albariño	3-2-1	pGreenI29-VvFT	6	23277	0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
17	2012	Albariño	24-1	pGreenI29-VvFT	6	5995	0	0
				pGreenII179-VvFT	6		6	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
				pGreenII179-Vvgai	6		0	0
23	2012	Albariño	24-1	pGreenI29-VvFT	6	Fallo	0	0
				pGreenII179-VvFT	6		0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
				pGreenII179-Vvgai	6		0	0
11	2012	Albariño	1-1	pGreenI29-VvFT	6	137	0	0
				pGreenII179-VvFT	6		0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
5	2011	Albariño	C1	pGreenII179-Vvgai	6	62	0	0
9	2012	Albariño	C5	pGreenII179-Vvgai	6	1323	0	0
				pGreenII179-VvFT	6		0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
10	2012	Albariño	20-1	pGreenI29-VvFT	6	165	0	0
				pGreenII179-VvFT	6		0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
24	2013	Albariño	21	pGreenI29-VvFT	6	5616	13	0
				pGreenI29-Vvgai	6		35	0
31	2013	Albariño	34	pGreenI29-VvFT	6	Fallo	0	0
				pGreenII179-VvFT	6		0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0
				pGreenII179-Vvgai	6		0	0
3	2011	Tempranillo	1-3	pGreenII179-Vvgai	3	2353	0	0
4	2011	Tempranillo	1-4	pGreenII179-Vvgai	6	630	3	0
20	2012	Tempranillo	C42	pGreenI29-VvFT	6	19437	0	0
				pGreenII179-VvFT	6		0	0
				pGreenI29-Vvgai	6		0	0

Como se observa en la tabla el número de ensayos realizados con el cv. ‘Albariño’ ha sido muy superior a los llevados a cabo con la variedad ‘Tempranillo’ debido a la dificultad de obtener suspensiones celulares adecuadas. En cuanto a la respuesta de regeneración también fue claramente diferencial entre ambas variedades. Se obtuvieron 3 embriones del cv. ‘Tempranillo’, pero no se obtuvo ninguna planta en estos ensayos. Por el contrario, del cv. ‘Albariño’ se regeneraron 410 (135 con construcciones portadoras del gen *VvFT* y 275 con las portadoras del gen *Vvgai*) (tabla 21). El rendimiento final, sin embargo, fue muy inferior, únicamente 30 embriones se desarrollaron en plantas: 9 con el gen *VvFT* (2 provienen del pGreenI 29 y 7 del pGreenII 179) y 21 con el *Vvgai* (2 del pGreenI 29 y 19 del pGreenII 179) (Tabla 21). También cabe señalar que la mayoría de los embriones que fueron capaces de desarrollarse en planta (26) fueron seleccionados en medio con higromicina por lo que este antibiótico parece más adecuado para la selección en estos cultivares. Si se comparan las construcciones utilizadas, el plásmido pGreenII 179 dio rendimientos de transformación ligeramente superiores al pGreenI 29 (Tabla 21).

Tabla 21: Número de embriones y plantas obtenido tras la transformación con los diferentes plásmidos.

Plásmidos	Ensayos	Placas	Embriones	Plantas
pGreenI29- <i>VvFT</i>	20	117	66	2
pGreenI29- <i>Vvgai</i>	23	141	130	2
pGreenII179- <i>VvFT</i>	22	128	69	7
pGreenII179- <i>Vvgai</i>	26	155	145	19
Total	<b>91</b>	541	410	<b>30</b>
Total kanamicina	43	258	196	4
Total higromicina	48	283	214	26
Total <i>VvFT</i>	42	245	135	9
Total <i>Vvgai</i>	49	296	275	21

Puesto que la cantidad de placas utilizadas y la línea de la suspensión celular de partida es diferente entre los experimentos debido a la disponibilidad de material vegetal en los momentos de realización de los ensayos (las suspensiones celulares van variando su biomasa con respecto al tiempo) no se puede afirmar que los plásmidos pGreenII 179 funcionen mejor que los pGreenI 29 pero se ha obtenido un mayor número de plantas al utilizar el pGreenII 179.

Las plantas obtenidas se mantuvieron con subcultivos periódicos y se llevaron a cabo reacciones PCR para detectar el gen de selección de la kanamicina o la higromicina así como los genes de floración (*VvFT* o *Vvgai*). Se obtuvo amplificación del gen de selección *hptI* en 4 plantas del experimento 14 (plantas pGreenII-179). Sin embargo, este resultado no se repitió en sucesivas pruebas para confirmar la presencia del transgén en plantas más adultas. Por lo tanto las plantas regeneradas no integraron correctamente el transgén aunque fueron capaces de regenerar en medio selectivo.

El resultado obtenido está en concordancia con la dificultad descrita en distintos trabajos para la obtención de plantas transformadas y estables mediante biolística (Saporta *et al.* 2016). En Vidal *et al.* (2003) en el cv. ‘Chardonnay’, obtuvieron aproximadamente 7900 eventos de transformación transitoria por placa, acabando en 46 estructuras transformadas tras 95 días, y de ellas, solamente entre 2 y 3 embriones se desarrollaron en planta confirmándose la integración del transgén en una de ellas.

La principal limitación de la técnica sigue siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y en número final de células que consiguen incorporar de manera permanente el gen al genoma y acaban convertidas en plantas. En los últimos años, las transformaciones han ido encaminadas a la utilización del método de transformación mediante *Agrobacterium* en lo que se refiere a la transformación estable, mientras que la transformación mediante biolística se ha utilizado para los estudios de transformación transitoria (Jelly *et al.* 2014; Vidal *et al.* 2010). Además, el cv. ‘Tempranillo’ y el cv. ‘Albariño’ parecen ser recalcitrantes a la transformación y especialmente a la mediada por biolística, pues no se han publicado trabajos de transformación estable. Por contra, Gago *et al.* (2011), han conseguido transformar el cv. ‘Albariño’, mediante el método mediado por *Agrobacterium*.

### 6.3.3 INTRODUCCIÓN DE LOS GENES *VvFT* Y *VvGAI* MEDIANTE TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR *A. TUMEFACIENS*.

Se utilizó el protocolo publicado por Torregrosa *et al.* (2015) y el plásmido pGreenII 179, que contiene el gen de resistencia a la higromicina para llevar a cabo estos ensayos. La sensibilidad a kanamicina mostrada por el ‘Albariño’ nos ha hecho descartar la selección con este antibiótico, utilizando para ambas variedades la selección con higromicina. Se realizó una estancia breve en el laboratorio del Dr. Torregrosa en el SupAgro-INRA (Francia) para llevar a cabo estas transformaciones. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 22).

Se utilizaron distintas condiciones de selección ya que en distintos trabajos puede verse que la selección depende de la línea y los callos utilizados (Saporta *et al.* 2014 y 2016). Así por ejemplo en Torregrosa *et al.* (2015) se recomienda una primera selección más restrictiva durante el primer mes, con una concentración alta de antibiótico con el objetivo de asegurarse de que los embriones que sobreviven tienen resistencia, y en los sucesivos meses de selección, ir disminuyendo la concentración de manera que se continúe la selección, pero permita que los embriones que sobrevivieron continúen desarrollándose sin una gran inhibición que podría provocar la muerte de estos. También Dutt *et al.* (2008) siguen esta secuencia. Por el contrario, en otros trabajos se utiliza una concentración de selección baja al inicio (Nirala *et al.* 2000; Mezetti *et al.* 2002; Gambino *et al.* 2005) En nuestro trabajo la selección ha sido más restrictiva (con mayor concentración de antibióticos) tras la transformación y ha disminuido con el tiempo.

Tabla 22: Experimentos de transformación mediante *Agrobacterium* con las variedades ‘Albariño’ y ‘Tempranillo’. Se especifica la línea celular, los gramos de callo iniciales utilizados en la transformación (el mismo peso para cada uno de los plásmidos), los plásmidos utilizados, la concentración de antibiótico utilizada (en mgL<sup>-1</sup>), el número de plantas obtenidas después de la selección.

Experimento	Variedad	Línea	g de callo	Plásmidos	Concentración de antibiótico	Plantas
1	Tempranillo	7	2	pGreenII179-VvFT	12,5/6,5/12,5	6
				pGreenII179-Vvgai		15
2	Tempranillo	7	1	pGreenII179-VvFT	12,5/20/12,5	9
				pGreenII179-Vvgai		9
3	Albariño	47	2	pGreenII179-VvFT	12,5/2,5/2,5	2
				pGreenII179-Vvgai		1
4	Albariño	47	1	pGreenII179-VvFT	15/2,5/2,5	1
				pGreenII179-Vvgai		0
5	Albariño	9	0,7	pGreenII179-VvFT	15/2,5/2,5	16
				pGreenII179-Vvgai		2
				pGreenII179-VvFT		0

6	Albariño	26	0,7	pGreenII179-Vv <i>gai</i>	15/2,5/2,5	1
				pGreenII179-Vv <i>FT</i>		0
7	Albariño	9	1	pGreenII179-Vv <i>gai</i>	15/2,5/2,5	13
				pGreenII179-Vv <i>FT</i>		0
8	Albariño	47	1	pGreenII179-Vv <i>gai</i>	15/2,5/2,5	0
				pGreenII179-Vv <i>FT</i>		6
9	Albariño	9	1	pGreenII179-Vv <i>gai</i>	20/5/2,5	12
				pGreenII179-Vv <i>FT</i>		0
10	Albariño	23	1	pGreenII179-Vv <i>gai</i>	20/5/2,5	0
				pGreenII179-Vv <i>FT</i>		0
11	Albariño	26	1	pGreenII179-Vv <i>gai</i>	20/5/2,5	0
				pGreenII179-Vv <i>FT</i>		0
12	Albariño	47	2	pGreenII179-Vv <i>gai</i>	20/5/2,5	4
				pGreenII179-Vv <i>FT</i>		0
13	Albariño	26	1	pGreenII179-Vv <i>gai</i>	20/5/2,5	0
				pGreenII179-Vv <i>FT</i>		0
14	Albariño	23	1	pGreenII179-Vv <i>gai</i>	20/5/2,5	0

De estos experimentos se obtuvieron un total de 97 plantas, 40 con construcciones portadoras del gen *VvFT* y 57 con el gen *Vvgai*. El número de plantas de Tempranillo fue de 39 y de 58 en Albariño. Estas plantas se mantuvieron en medio WP y se clonaron para poder obtener más plantas y material suficiente para realizar extracción de ADN y de ARN.

#### 6.3.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR LAS PLANTAS REGENERADAS: INSERCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS TRANSGENES.

Con el objetivo de comprobar la inserción de los transgenes se realizó una extracción de ADN de las plantas transformadas y se utilizaron cebadores específicos para amplificar el gen de interés y también parte del promotor con el objetivo de diferenciar el endógeno del introducido. Se repitió el proceso dos o tres veces para confirmar los resultados (en la Figura 32 puede visualizarse uno de los geles para cada uno de los genes de floración). En la siguiente tabla se muestra la eficiencia definida como número de plantas positivas para el gen de interés por PCR con respecto al total de plantas regeneradas para cada uno de los plásmidos ensayados.

Tabla 23: Eficiencia de transformación en las plantas regeneradas de los experimentos de transformación mediante *A. tumefaciens* comprobadas mediante PCR.

Experimento	Variedad	Plásmidos	Plantas	Plantas PCR +	Eficiencia (%)
1	Tempranillo	pGreenII179-Vv <i>FT</i>	6	3	50
		pGreenII179-Vv <i>gai</i>	15	11	73,3
2	Tempranillo	pGreenII179-Vv <i>FT</i>	9	4	44,4
		pGreenII179-Vv <i>gai</i>	9	8	88,88
3	Albariño	pGreenII179-Vv <i>FT</i>	2	1	50
		pGreenII179-Vv <i>gai</i>	1	0	0
4	Albariño	pGreenII179-Vv <i>FT</i>	1	0	0
		pGreenII179-Vv <i>gai</i>	0	0	0
5	Albariño	pGreenII179-Vv <i>FT</i>	16	4	25
		pGreenII179-Vv <i>gai</i>	2	1	50
6	Albariño	pGreenII179-Vv <i>FT</i>	0	0	0
		pGreenII179-Vv <i>gai</i>	1	0	0
7	Albariño	pGreenII179-Vv <i>FT</i>	0	0	0
		pGreenII179-Vv <i>gai</i>	13	1	7,7

8	Albariño	pGreenII179-VvFT	0	0	0
		pGreenII179-Vvgai	0	0	0
9	Albariño	pGreenII179-VvFT	6	4	66,7
		pGreenII179-Vvgai	12	6	50
10	Albariño	pGreenII179-VvFT	0	0	0
		pGreenII179-Vvgai	0	0	0
11	Albariño	pGreenII179-VvFT	0	0	0
		pGreenII179-Vvgai	0	0	0
12	Albariño	pGreenII179-VvFT	0	0	0
		pGreenII179-Vvgai	4	0	0
13	Albariño	pGreenII179-VvFT	0	0	0
		pGreenII179-Vvgai	0	0	0
14	Albariño	pGreenII179-VvFT	0	0	0
		pGreenII179-Vvgai	0	0	0

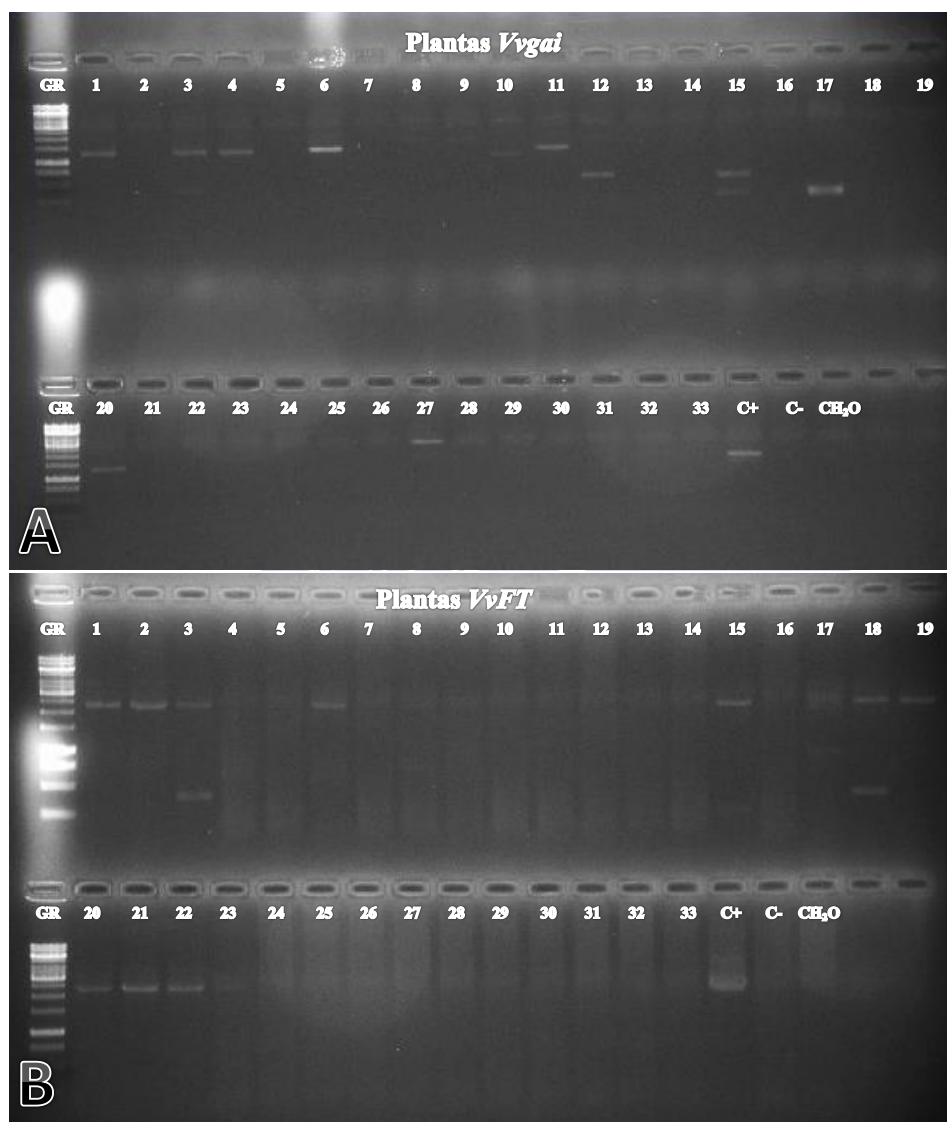


Figura 32: Visualización de la separación de los productos de PCR de las plantas transformadas. A: Amplificación con cebadores directo en el promotor 35S y reverso en el gen *Vvgai* (banda de aproximadamente 1300 pb) B: Amplificación con los cebadores directo en el gen *VvFT* y reverso en el gen de la higromicina (banda de aproximadamente 2400 pb). El marcador de peso utilizado fue GeneRuler 1kb. Control +: Plásmido pGreenII 179+*Vvgai* o pGreenII 179+*VvFT*; Control -: Planta sin transformar. Control H<sub>2</sub>O: Control mastermix sin ADN a amplificar.



Los resultados de amplificación no obstante no eran claros. Además de la amplificación de los fragmentos esperados, en algunas muestras se obtenían amplificaciones inespecíficas (Figura 32). De las 40 plantas regeneradas en el ensayo para introducir el gen *VvFT*, solo en 16 amplificó el gen de interés con tamaño esperado (7 plantas de ‘Tempranillo’ y 9 de ‘Albariño’); de las 57 regeneradas en el ensayo con el gen *Vvgai*, amplificaron 27 (19 de ‘Tempranillo’ y 8 de ‘Albariño’). Estos resultados indican que al menos el 40% y el 47,4% de las plantas regeneradas en condiciones selectivas en estos ensayos podrían haber insertado correctamente el gen *VvFT* y el gen *Vvgai*, respectivamente.

Se realizó una prueba a las plantas regeneradas con el medio de Schroth (Schroth *et al.* 1965), específico de crecimiento de la bacteria *Agrobacterium* con el objetivo de comprobar que las amplificaciones no eran debidas a una contaminación por parte de la bacteria. No se produjo crecimiento tras el cultivo durante 4 días a 27° C, lo que indicaba la no contaminación.

La escasa repetibilidad de las amplificaciones obtenidas en las reacciones de PCRs nos llevó a secuenciar los fragmentos amplificados para diferenciar las plantas transformadas con *Vvgai*. En vid se ha descrito la importancia de la calidad en la extracción del ADN debido a que puede contener contaminantes como proteínas, polifenoles y polisacáridos (Rezadoost *et al.* 2016), y estos pueden interferir con enzimas como la *Taq* polimerasa en las reacciones de PCR (Angeles *et al.* 2005, Ogunkanmi *et al.* 2008) arrojando datos no verdaderos en la amplificación.

De las 27 plantas que amplificaron el gen *Vvgai* en el screening por PCR, se secuenciaron 13 plantas (1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 42). El cebador utilizado para la secuenciación fue el reverso, pues el directo se une muy próximo a la mutación y al principio de la secuencia y podría entrar dentro del error del aparato, superponiéndose a ese error y generando falsas bases.

De las 13 plantas secuenciadas (11 del cv. ‘Tempranillo’ y 2 del cv. ‘Albariño’), 6 han mostrado el heterocigoto (A+T) la 1, la 2, la 6, la 11, la 14 y la 42, mientras que las demás son como el control. Al utilizar como cebador de la secuenciación el reverso, la secuencia que se observa en los cromatogramas (Figura 33) es la complementaria. De este modo, la base del gen salvaje (T) aparece como A, y la base del gen mutado (A), aparece como T.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que el gen mutante *Vvgai* está insertado en estas plantas, ya que en la planta control no se observa el heterocigoto, que correspondería con la amplificación tanto del gen salvaje como del mutante. En el resto de plantas, las secuencias y los cromatogramas son equivalentes a los del control. No se ha conseguido transformar ninguna planta del cultivar ‘Albariño’, solamente del ‘Tempranillo’. De las plantas enviadas a secuenciar, el 46% han resultado heterocigotas.

Estos cultivares (Albariño y Tempranillo) parecen tener bastante más dificultad para la transformación que otros como los cultivares ‘Chardonnay’ o ‘Thompson Seedless’, en donde se han publicado la mayoría de los trabajos de transformación de *V. vinifera* (Saporta *et al.* 2016).



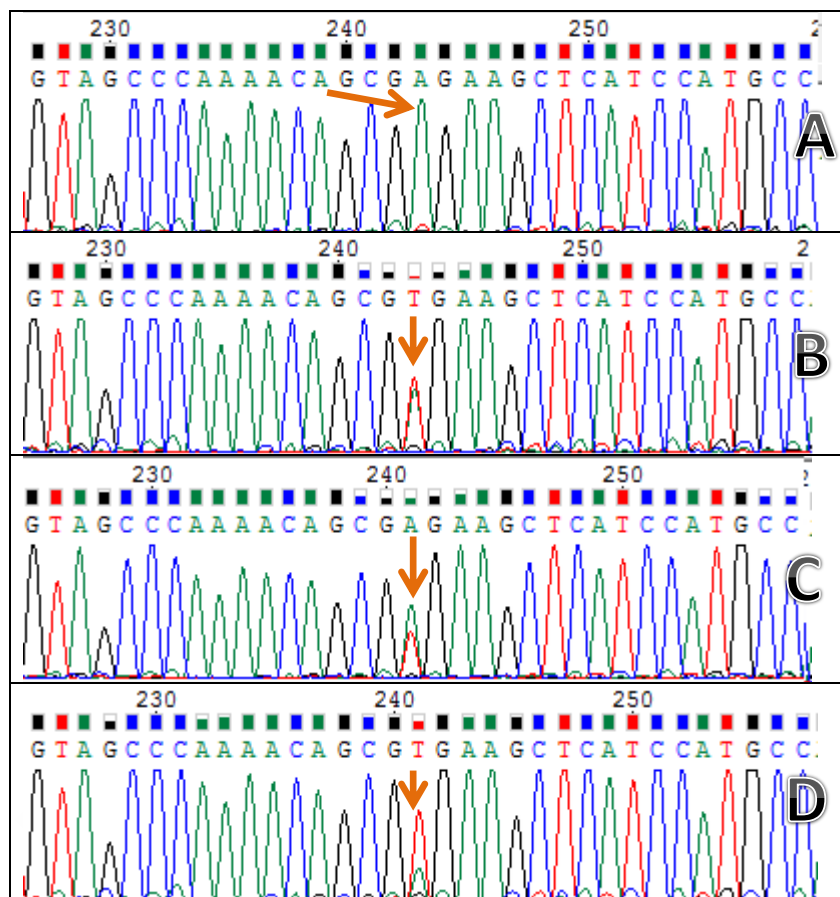


Figura 33: Fragmento del cromatograma de la secuenciación de plantas *Vvgai*. A: Control; B: *Vvgai* 6; C: *Vvgai* 11; D: *Vvgai* 14. La flecha naranja indica la posición de la mutación en la secuencia.

De las plantas positivas por PCR para los genes de floración, se realizó una extracción de ARN por varios métodos (ya que se ha descrito en trabajos como Tattersall *et al.* (2005), Gambino *et al.* (2008) o Paylan *et al.* (2014) que la calidad del ARN obtenido en la vid es de vital importancia para la correcta realización de la RT-PCR. Se realizaron extracciones con Ribozol<sup>TM</sup>, mediante el kit RNeasy<sup>®</sup> de Qiagen<sup>®</sup> y con un protocolo basado en el CTAB descrito en Gambino (2015). Los resultados pueden observarse en el Anexo 7. En definitiva, podría decirse que con el protocolo del CTAB se podrían conseguir unos ratios 260/280 y 260/230 más cercanos a 2, lo que indicaría una mayor pureza del ARN y una menor contaminación de sustancias que podrían inhibir la RT-PCR posterior.

#### 6.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS.

Durante el primer año después de haber comenzado los experimentos, se observó que algunas plantas transformadas con el *VvFT* florecían *in vitro* (Figura 34), mientras que las transformadas con *Vvgai* y las plantas control no lo hacían. Estas plantas coincidían con aquellas que habían sido positivas para la PCR. Además, en sucesivos subcultivos volvieron a florecer.

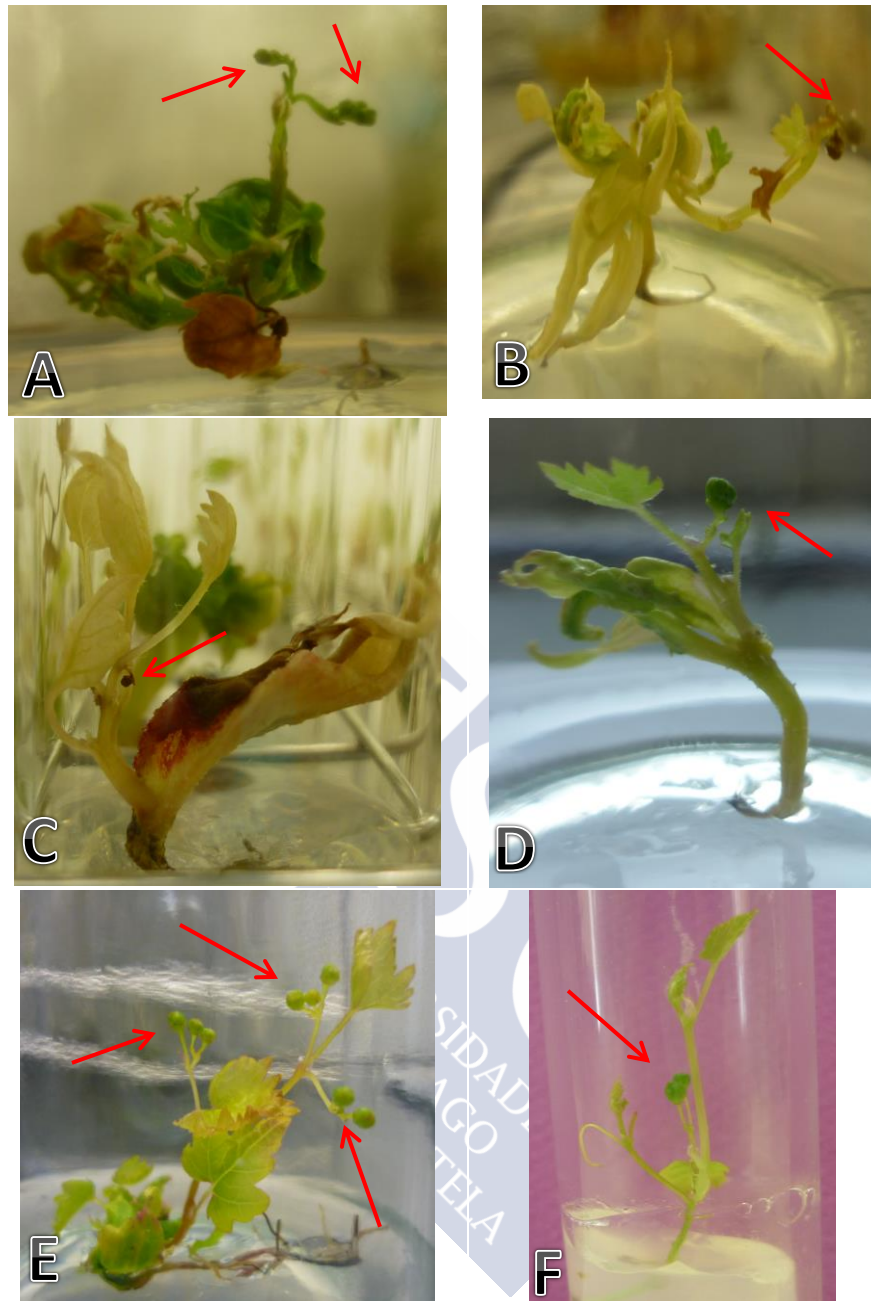


Figura 34: Plantas florecidas *in vitro* de las plantas transformadas con el gen *VvFT* tras 1 año desde el experimento de transformación. A: MR1 Tem *VvFT* 1; B: Experimento 1 Tem *VvFT* 13; C: Experimento 1 Tem *VvFT* 10; D: Experimento 2 Tem *VvFT* 2; E: Experimento 2 Tem *VvFT* 19; F: Experimento 6 Alb9 *VvFT* 26.

Esta floración en estadios tempranos de la planta se debe probablemente a la sobreexpresión del gen *VvFT* (Carmona *et al.* 2007 a y b; Díaz-Riquelme *et al.* 2012) ya que no ocurre en las demás plantas cultivadas en las mismas condiciones y confirmaría la expresión del gen en esas plantas que mostraron integración del mismo (Figura 32B).

Por otro lado, se han observado las plantas transformadas con el gen *Vvgai*. Estas deberían tener un fenotipo enano o intermedio, ya que la mutación es semidominante (Boss y Thomas, 2002; Chaïb *et al.* 2010). Para comprobarlo se midió el crecimiento (altura en centímetros) de las plantas disponibles 45 días después del cultivo *in vitro* de yemas

axilares de cada fenotipo (un mínimo de 6 clones de cada una de ellas). La medida se realizó desde la base hasta el ápice de la planta utilizando como control el mutante PM 179 y ‘Tempranillo’ no transformado.

Tabla 24: Tamaños de 7 plantas del cv. ‘Tempranillo’ (en cm) cultivadas *in vitro* (45 días) y consideradas positivas tras comprobar la integración del gen *Vvgai* por secuenciación.

	<i>Vvgai</i> 2	<i>Vvgai</i> 3	<i>Vvgai</i> 6	<i>Vvgai</i> 7	<i>Vvgai</i> 10	<i>Vvgai</i> 14	<i>Vvgai</i> 42	Tempranillo	Mutante PM 179
Media	10,04 <sup>cd</sup>	10,13 <sup>cd</sup>	6,07 <sup>a</sup>	10,53 <sup>d</sup>	8,57 <sup>bc</sup>	6,32 <sup>ab</sup>	8,42 <sup>cd</sup>	9,52 <sup>cd</sup>	<b>4,34<sup>a</sup></b>
DesvEst	3,20	2,50	3,79	2,53	2,52	1,94	2,02	1,71	<b>0,54</b>
Error	1,01	0,83	2,19	0,73	0,70	0,65	0,61	0,49	<b>0,24</b>

En la Tabla 24 se observa que las plantas *Vvgai* 6 y la planta del mutante L1 179 del Pinot Menier cultivadas *in vitro* muestran similar altura, mientras que las plantas *Vvgai* 2, 3, 7 y 42 son iguales o mayores al control Tempranillo, y que las plantas *Vvgai* 10 y 14 muestran una altura intermedia a la de los dos controles.

Una selección de plantas *VvFT* positivas por PCR (planta *VvFT* 3, 10, 13, 18, 19, 21, 23, 26) y *Vvgai* positivas por secuenciación (planta *Vvgai* 2, 6, 14 y 42) junto con otras plantas transformadas no positivas por secuenciación (plantas 7, 8, 9, 10 y 12), fueron transplantadas a invernadero (3 clones de cada planta). La floración de las plantas en el invernadero se podría observar probablemente esta primavera o la siguiente.

Para las plantas *Vvgai*, se midieron la altura total, el número de entrenudos y su longitud tras ocho meses para compararlas con los controles. Las medias de las plantas positivas para *Vvgai* mediante secuenciación se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25: Tamaño de las plantas transformadas *Vvgai* positivas por secuenciación crecidas en invernadero tras 8 meses.

Plantas	Mutante PM 179	Tempranillo	<i>Vvgai</i> 2	<i>Vvgai</i> 6	<i>Vvgai</i> 14	<i>Vvgai</i> 42
Altura Media	19,40±0,40 <sup>a</sup>	80,50±5,50 <sup>d</sup>	25,75±4,29 <sup>ab</sup>	20,80±0,20 <sup>a</sup>	31,50±2,50 <sup>bc</sup>	36,00±2,00 <sup>c</sup>
Nº entrenudos medio	29,50±2,5 <sup>a</sup>	19,50±0,71 <sup>b</sup>	21,50±1,22 <sup>b</sup>	19,00±1,00 <sup>b</sup>	21,5±0,50 <sup>b</sup>	21,50±0,50 <sup>b</sup>
Longitud media del entrenudo	0,58±0,03 <sup>a</sup>	3,02±0,22 <sup>e</sup>	1,24±0,09 <sup>bc</sup>	1,05±0,06 <sup>b</sup>	1,53±0,08 <sup>cd</sup>	1,68±0,11 <sup>d</sup>

Los clones de las plantas *Vvgai* positivas en la secuenciación mostraron un tamaño intermedio entre los controles ‘Tempranillo’ y el Mutante PM 179, mostrando el carácter semidominante de la mutación que provoca el enanismo (Boss y Thomas 2002; Chaïb *et al.* 2010), siendo la planta número 6 la más parecida en altura al mutante, y la 42 la que menos (Tabla 25). Por otro lado, no hubo diferencias entre el número de entrenudos de las plantas transformadas *Vvgai* y el control ‘Tempranillo’. Sin embargo, la longitud de los entrenudos sí mostró diferencias, siendo longitudes intermedias entre los dos controles (Tabla 25). De todas las plantas transformadas, las plantas *Vvgai* 6 fue la más parecida al mutante PM 179, mientras que la planta 42 fue más parecida al control Tempranillo. Las plantas 2 y 14 son intermedias (Figura 35). Las plantas 7, 8, 9, 10 y 12 no mostraron diferencias con el control Tempranillo. Las plantas transformadas *VvFT* crecieron de forma similar al control.

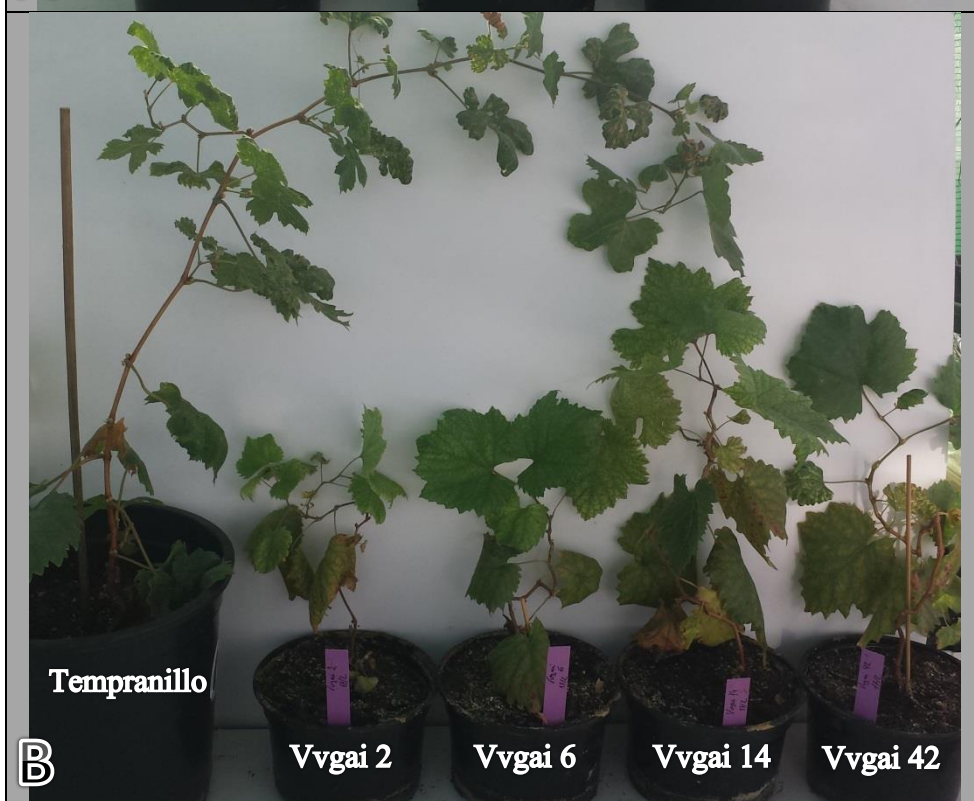
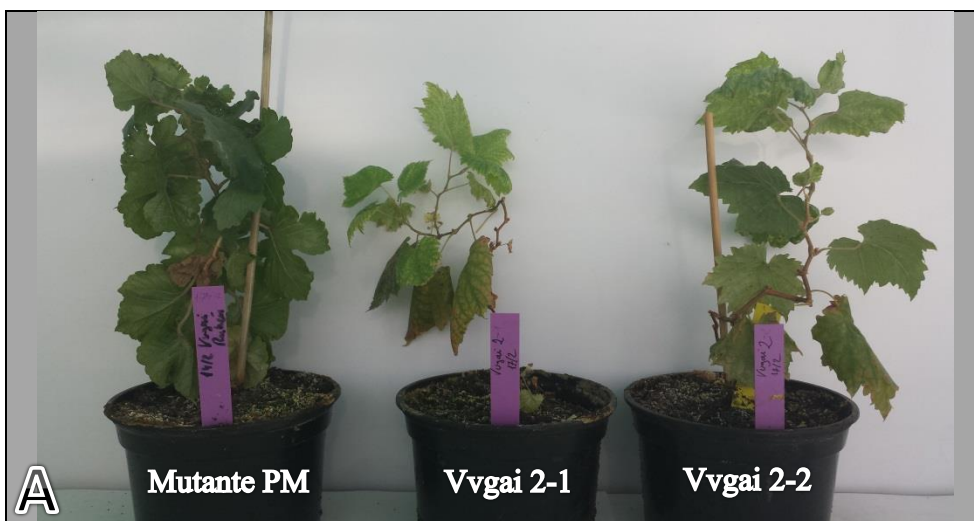






Figura 35: Plantas *Vvgai* y controles en invernadero. A: Comparativa de plantas transformadas *Vvgai* 2 con el mutante PM 179. B: Comparativa de plantas *Vvgai* con el control 'Tempranillo'. C: Comparativa de una planta transformada *Vvgai* 6 con los controles 'Tempranillo' y mutante PM 179.

Durante los 8 meses en que las plantas estuvieron en el invernadero no se observó la floración ni en las plantas transformadas *VvFT* ni en las *Vvgai* que es esperable porque es poco tiempo teniendo en cuenta que el periodo juvenil en vid es de tres a cuatro años.

El disponer de plantas de los cultivares 'Tempranillo' y 'Albariño' transformadas con el gen *Vvgai* que muestran menor porte y se espera acorten el periodo juvenil, será de utilidad para llevar a cabo estudios genéticos en ambientes pequeños y controlados. En plantas que expresan este gen se ha observado además de un pequeño porte, que se mantiene el tamaño de la baya y la generación de semillas (Boss y Thomas 2002; Chaïb *et al.* 2010), por lo que estas plantas podrían ser una herramienta útil para dichos estudios genéticos. Además, en el futuro si cambia la legislación sobre plantas transgénicas, podrían utilizarse para derivar nuevas variedades.



## **CONCLUSIONES**





## 7. CONCLUSIONES

1. En cuanto a la capacidad embriogénica, el cultivar ‘Albariño’ ha mostrado una mayor capacidad en formación de callos embriogénicos que el cultivar ‘Tempranillo’. Los ovarios en estadio de desarrollo III son los explantes más adecuados para la inducción de la embriogénesis en las variedades estudiadas, ya que se ha obtenido bajos porcentajes de necrosis y una alta respuesta embriogénica, contrariamente a lo ocurrido con las anteras. Los dos medios de cultivo comparados inducen la respuesta, siendo el medio MSE el que ha proporcionado mejores rendimientos para ambas variedades: un 8,13 % en ‘Tempranillo’ y un 26,88% en ‘Albariño’. La transferencia al medio de cultivo C<sup>1</sup>P para el mantenimiento de los callos embriogénicos ha sido adecuada para disponer de líneas embriogénicas y establecer suspensiones celulares para llevar a cabo los ensayos de transformación.
2. Las conclusiones obtenidas tras el estudio de distintos factores que influyen en la transformación vía biolística son: 1) Las partículas de oro de 1 ó 0,6 micras con una velocidad de agitación de 1000 rpm, han resultado las más óptimas para realizar la adherencia del ADN en los ensayos de transformación vía biolística (siguiendo el protocolo de Kikkert *et al.* 2004). No se ha obtenido ningún evento de transformación al utilizar tungsteno ni la partícula experimental de dióxido de titanio por lo que se descartan estos materiales para su uso en ensayos de transformación en estas variedades de vid. 2) la sensibilidad al antibiótico utilizado en el medio de selección es distinta para las variedades ‘Albariño’ y ‘Tempranillo’ y también existe variabilidad entre líneas celulares, siendo el cultivar ‘Albariño’ más sensible que el cv. ‘Tempranillo’ (que reduce notablemente su crecimiento a concentraciones de antibiótico de 20-30 mgL<sup>-1</sup>). La respuesta en medio con higromicina es más uniforme para ambas variedades que ven inhibido su crecimiento a concentraciones superiores a 10 mgL<sup>-1</sup>. La capacidad de germinación de los embriones seleccionados con higromicina fue superior a la de los seleccionados con kanamicina por lo que se ha seleccionado la primera para los siguientes experimentos de transformación con *A. tumefaciens* donde el protocolo de Torregrosa *et al.* (2015) ha resultado adecuado.
3. La introducción de los genes *VvFT* y *Vvgai* relacionados con la floración temprana en los plásmidos pGreenI 29 y pGreenII 179 ha sido exitosa, confirmándose la correcta integración de los mismos. Estos plásmidos han resultado adecuados para llevar a cabo los ensayos de transformación mediante el método biolístico y la mediada por *A. tumefaciens*.

4. La transformación biolística ha proporcionado altas tasas de transformación transitoria pero muy bajo rendimiento en cuanto a la regeneración, sin observarse integración estable. Por lo que esta metodología en estos cultivares solo se recomienda para estudios de expresión transitoria. La transformación mediada por *A. tumefaciens* ha resultado en un mayor número de plantas regeneradas portadoras de los genes *VvFT* y *Vvgai* en ambos cultivares. La integración del transgen *Vvgai* mediante secuenciación se ha podido corroborar únicamente en las plantas del cultivar ‘Tempranillo’.
5. En el marco de esta tesis se ha podido comprobar que algunas de las plantas *VvFT* florecieron *in vitro*, mientras que las que han integrado el gen *Vvgai* han mostrado, como era esperable, menor altura y entrenudos muy cortos al cultivarlas en invernadero. Se espera también que ambas acorten también el periodo juvenil como se ha observado en otros trabajos, y por lo tanto, que representen unos materiales útiles en programas de mejora.





## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Agüero, C.B., Uratsu, S., Greve, C., Powell, A., Labavitch, J.M., Meredith, C.P. y Dandekar, A.M. (2005). Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Mol. Plant Pathol.* 6(1), 43-51.
- Angeles, J.C., Laurena, A.C. y Mendoza, E.M. (2005). Extraction of genomic DNA from the lipid-, polysaccharide-, and polyphenol-rich coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.*, 23, 297a-297i.
- Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F. y Yanofsky, M.F. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: Expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.*, 24, 457-466.
- Alwine J.C., Kemp, D.J. y Stark, G.R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 (12), 5350-4.
- Alzubi, H., Yepes, L.M. y Fuchs, M. (2012). Enhanced micropropagation and establishment of grapevine rootstock genotypes. *Inter. Jour. Of Plant Devel. Bio.*, 6 (1), 9-14.
- Baribault, T.J., Skene, K.G.M. y Scott, N.S. (1989). Genetic transformation of grapevine cells. *Plant Cell Reports*, 8, 137-140.
- Beeston, J. (2001). A Concise History of Australian Wine (en inglés) (3ª edición). Allen & Unwin Pty., Limited.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 62, 293-300.
- Bogs, J., Jaffé, F., Takos, A., Walker, A. y Robinson, S.P. (2007) The grapevine transcription factor *VvMYBPA1* regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiology* 143, 1347-1361.
- Bornhoff, B. A., Harst, M., Zyprian, E. y Töpfer, R. (2005). Transgenic plants of *Vitis vinifera* cv. 'Seyval blanc'. *Plant Cell Rep.*, 24, 433-438.
- Boss, P.K., y M.R. Thomas. (2000). Tendrils, inflorescences and fruitfulness: A molecular perspective. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 6 ,168-174.
- Boss, P.K. y Thomas M.R. (2002). Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature*, 416, 847-850.
- Boss, P.K., Buckeridge, E.J., Poole, A. y Thomas, M.R. (2003). New insights into grapevine flowering. *Funct. Plant Biol.*, 30, 593-606.

- Boss, P.K., Sreekantan, L. y Thomas, M.R. (2006). A grapevine TFL1 homologue can delay flowering and alter floral development when overexpressed in heterologous species. *Funct. Plant Biol.*, 33, 31-41.
- Bouquet, A., Pauquet, J., Adam-Blondon, A.F., Torregrosa, L., Merdinoglu, D. y Wiedemann-Merdinoglu, S. (2000). Towards the obtention of grapevine varieties resistant to powdery and downy mildews by conventional breeding and biotechnology (in French with English summary). *Le Bulletin de l'OIV*, 73 (833-834), 445-451.
- Bouquet, A., Torregrosa, L., Iocco, P. y Thomas, M.R. (2008). Grapes. En: C. Kole y T.C. Hall (Eds.), *Compendium of Transgenic Crop Plants, vol 4. Transgenic Temperate Fruits and Nuts* (pp. 182-232). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Burnette, H. W. (1981). 'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112 (2), 195-203.
- Cabello, F., Ortiz, J.M. y Muñoz, G. (2011). *Variedades de vid en España*. Madrid: Editorial Agrícola Española S.A.
- Calonje, M., Cubas, P., Martínez-Zapater, J.M. y Carmona, M.J. (2004). Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in Grapevine. *Plant Physiology*, 135, 1491-1501.
- Carmona, M.J., Cubas, P. y Martínez-Zapater, J.M. (2002). *VFL*, the grapevine *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiology*, 130, 68-77.
- Carmona, M.J., Cubas, P. y Martínez-Zapater, J.M. (2007a). The *FT/TFL1* gene family. *Plant Mol. Biol.*, 63, 637-650.
- Carmona, M.J., Cubas, P., Calonje, M. y Martínez-Zapater, J.M. (2007b). Flowering transition in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Can. J. Bot.*, 85, 701-711.
- Carmona, M.J., Chaib, J., Martínez-Zapater, J.M. y Thomas, M.R. (2008). A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *J. Exp. Bot.*, 59, 2579.
- Chaib, J., Torregrosa, L., Mackenzie, D., Corena, P., Bouquet, A. y Thomas, M.R. (2010). The grape microvine — a model system for rapid forward and reverse genetics of grapevines. *The Plant Journal*, 62, 1038-1092.
- Christou, P. y Klee, H. (2004). *Handbook of plant biotechnology. Vol I and II* (pp. 1420). Est Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Cluster, P.D., O'Dell, M., Metzloff, M. y Flavell, R.B. (1994). Details of T-DNA structural organisation from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Mol. Biol.*, 32, 1197-1203.

Crane, O., Halaly, T., Pang, X., Lavee, S., Perl, A., Vankova, R. y Or, E. (2012). Cytokinin-induced *VvTFL1A* expression may be involved in the control of grapevine fruitfulness. *Planta*, 235, 181–192.

Consellería do medio rural e do mar. Xunta de Galicia.  
<http://www.medioruralemarr.xunta.es>

Colby, S.M., Juncosa, A.M. y Meredith, C.P. (1991). Cellular differences in *Agrobacterium* susceptibility and regenerative capacity restrict the development of transgenic grapevines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116(2), 56-361.

Costantini, E., Landi, L., Silvestroni, O., Pandolfini, T., Spena, A. y Mezetti, B. (2007). Auxin synthesis-encoding transgene enhances grape fecundity. *Plant Physiol.*, 143, 1689-1694.

Cutanda, M.C., Bouquet, A., Chatelet, P., Lopez, G., Botella, O., Montero, F.J. y Torregrosa, L. (2008). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis vinifera* cultivars 'Macabeo' and 'Tempranillo'. *Vitis*, 47 (3), 159-162.

Dabauza, M., Velasco, L., Pazos-Navarro, M., Pérez-Benito, E., Hellín, P., Flores, P., Gómez-Garay, A., Martínez, M. C. y Lacasa, A. (2015). Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* in genetically-modified *Vitis vinifera* L. plants over-expressing the grapevine stilbene synthase gene. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 120, 229-238.

Dai, L., Zhou, Q., Li, R., Du, Y.D., He, J., Wang, D., Cheng, S., Zhang, J. y Wang, Y. (2015). Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 121, 397-412.

Dai, L., Wang, D., Xie, X., Zhang, C., Wang, X., Xu, Y., Wang, Y. y Zhang, J. (2016). The novel gene *VpPR4-1* from *Vitis pseudoreticulata* increases powdery mildew resistance in transgenic *Vitis vinifera* L. *Front. Plant Sci.* 7, article 695.

Dandekar, A. M., Gouran, H., Ibáñez, A. M., Uratsu, S. L., Agüero, C. B., McFarland, S., Borhani, Y., Feldstein, P. A., Bruening, G., Nascimiento, R., Goulart, L. R., Pardington, P. E., Chaudhary, A., Norvell, M., Civerolo, E. y Gupta, G. (2012). An engineered innate immune defense protects grapevines from Pierce disease. *PNAS*, 109, 3721-3725

Das, D.K., Reddy, M.K., Upadhyaya, K.C. y Sopory, S.K. (2002). An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell. Rep.*, 20, 999-1005.

Datla, R.S.S., Hammerlindl, J.K., Pelcher, L.E., Crosby, W.L. y Selvaraj, G. (1991). A bifunctional fusion between  $\beta$ -glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene*, 101, 239–246.



De la Torre, F.; Fernández, L., Saporta, R., Sanjurjo, L., Segura, A. y Vidal, J.R. (2012). Relationship among growth curve, nutrient consumption and genetic transformation efficiency of 'Albariño' (*Vitis vinifera*) cell suspensions. *Vitis*, 51(2), 73-78.

Deluc, L., Bogs, J., Walker, A.R., Ferrier, T., Decendit, A., Merillon, J.M., Robinson, S.P. y Barrieu, F. (2008). The transcription factor VvMYBB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*, 147, 2041–2053.

Denominación de origen Rias Baixas. <http://doriasbaixas.com>

Dhingra, A., Nicholson, K.L., Tarlyn, N., Armour, T. y Swanson, M.E. (2010). Effect of phyllotactic position and cultural treatments toward successful direct shoot organogenesis in dwarf "Pixie" grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111, 123-129.

Dhekney, S.A., Li, Z.T., Van Aman, M., Dutt, M., Tattersall, J., Kelley, K.T. y Gray, D.J. (2007). Genetic transformation of embryogenic cultures and recovery of transgenic plants in *Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia* and *Vitis* hybrids. *ACTA Hort.*, 738, 743-748.

Dhekney, S.A., Li, Z.T., y Gray, D.J. (2011). Grapevines engineered to express cisgenic *Vitis vinifera* thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 47, 458-466.

Díaz-Riquelme, J., Grimplet, J., Martínez-Zapater, J.M. y Carmona, M.J. (2012). Transcriptome variation along bud development in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Bio.*, 12, 181-194.

Dunn, G.M. y Martin, S.R. (2000). Do temperature conditions at budburst affect flower number in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon? *Aust. J. Grape Wine Res.*, 6, 116-124.

Dutt, M., Li, Z.T., Dhekney, S.A. y Gray, D.J. (2007). Transgenic plants from shoot apical meristems of *Vitis vinifera* L. "Thompson Seedless" via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell. Rep.*, 26, 2101-2110.

Dutt, M., Li, Z.T., Dhekney, S.A. y Gray, D.J. (2008). A co-transformation system to produce transgenic grapevines free of marker genes. *Plant Science*, 175, 423-430.

Fan, C., Pu, N., Wang, X., Wang, Y., Fang, L., Xu, W. y Zhang, J. (2008). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with a novel stilbene synthase gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92, 197-206.

FAOStat, 2013a. [http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities\\_by\\_regions/E](http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities_by_regions/E). Acceso el 25 de octubre de 2017.

FAOStat, 2014b. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QD/E>. Acceso el 25 de octubre de 2017.

FAOStat, 2014c. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acceso el 25 de octubre de 2017.

Ferreira, R. B., Monteiro, S. S., Piçarra-Pereira, M. A. y Teixeira, A. (2004). Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends Biotechnol.*, 22, 168-173.

Frame, B.R., Zhang, H., Cocciolone, S.M., Sidorenko, L.V., Dietrich, C.R., Pegg, S.E., Zhen, S., Schnable, P.S. y Wang, K. (2000). Production of transgenic maize from bombarded type II callus: Effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 36, 21-29.

Franks, T., Ding, G. y Thomas, M. (1998). Regeneration of transgenic *Vitis vinifera* L. Sultana plantas: Genetic and phenotypic analysis. *Mol. Breed.*, 4, 321-333.

Franks, T., Botta, R. y Thomas, M. R. (2002). Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 192-199.

Franks, T. K., Powell, J. S., Choimes, S., Marsh, E., Iocco, P., Sinclair, B. J., Ford, C. M. y Van Heewijck, R. (2006). Consequences of transferring three sorghum genes for secondary metabolite (cyanogenic glucoside) biosynthesis to grapevine hairy roots. *Transgenic Res.*, 15, 181-195.

Fu, X.D., Duc, L.T., Fontana, S., Bong, B.B., Tinjuangjun, P., Sudhakar, D., Twyman, R.M., Christou, P. y Kohli, A. (2000). Linear transgene construct lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research*, 9, 11-19.

Gago, J., Grima-Pettenati, J. y Gallego, P.P. (2011). Vascular-specific expression of GUS and GFP reporter genes in transgenic grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Albariño) conferred by the *EgCCR* promoter of *Eucalyptus gunnii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 413-419.

Gambino, G., Gribaudo, I., Leopold, S., Scharl, A. y Laimer, M. (2005). Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: I (2005). *Plant Cell Rep.* 24, 655-662.

Gambino, G., Perrone, I. y Gribaudo, I. (2008): A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem. Anal.*, 19, 520-525.

Gambino, G. (2015). Multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of nine grapevine viruses. En: I. Uyeda and C. Masuta (Eds.), *Plant Virology Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1236. New York: Springer Science+Business.

Gray, D.J. y Meredith, C.P. (1992). Grape. En: F.A. Hammerschlag y R.E. Litz (Eds.): *Biotechnology of perennial fruit crops* (pp. 229-262). Wallingford: CAB International.

Gray, D.J. (1995). Somatic embryogenesis in grape. En: S.Jain, P. Gupta y R. Newton (Eds.), *Somatic Embryogenesis in woody plants, vol 2* (pp. 191-217). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Gray, D.J., Li, Z.T., and Dhekney, S.A. (2014). Precision breeding of grapevine (*Vitis vinifera* L.) for improved traits. *Plant Sci.* 228, 3–10.

Goebel-Tourand, I., Mauro, M.C., Sossountazov, L., Miginiac, E. y Deloire, A. (1993). Arrest somatic embryo development in grapevine: histological characterization and the effect of ABA, BAP and zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, 33, 91-103.

Gölles, R., Da Camara Machado, A., Minafra, A., Savino, G., Saldarelli, G. P., Martelli, H., Puringer, H., Katinger, H. y Laimer Da Camara Machado, M. (1998). Transgenic grapevines expressing coat protein gene sequences of grapevine fanleaf virus, arabis mosaic virus, grapevine virus A and grapevine virus B. Résumé, VIIeme Symp. sur la Génétique et l'Amélioration de la Vigne, Montpellier, France.

Gölles, R., Da Camara Machado, A., Tsoлова, V., Bouquet, A., Moser, R., Katinger, H. y Laimer Da Camara Machado, M. (1997). Transformation of somatic embryos of *Vitis sp* with different constructs containing nucleotide sequences from nepovirus coat protein genes. *Acta Hortic.* 447, 265-272.

Gribaudo, I., Gambino, G. y Vallania, R. (2004). Somatic Embryogenesis from grapevine anthers: the optimal developmental stage for collecting explants. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55, 427-430.

Grotewold, E. (2003). Plant functional genomics. *Methods in Molecular Biology vol. 236* (pp. 449). Totowa: Humana Press.

Gutoranov, P., Tsvetkov, I., Colova-Tsoлова, V. y Atanassov, A. (2001). Genetically engineered grapevines carrying gflv coat protein and antifreeze genes. *Agric. Conspectus Scientificus*, 66, 71-76.

Harst, M., Bornhoff, B. A., Zyprian, E., Jach, G. y Töpfer, R. (2000a). Regeneration and transformation of different explants of *Vitis vinifera* spp. *Acta Hortic.*, 528, 289-295.

Harst, M., Bornhoff, B. A., Zyprian, E. y Töpfer, R. (2000b). Influence of culture technique and genotype on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos (*Vitis vinifera*) and their conversion to transgenic plants. *Vitis*, 39, 99-102.

He, R., Wu, J., Zhang, Y., Agüero C.B., Li, X.; Liu, S., Wang, C., Walker, M.A. y Lu, J. (2017). Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine. *Protoplasma* 254 (4), 1579-1589.

Hébert, D., Kikkert, J.R., Smith, F.D. y Reisch, B.I. (1993). Optimization of biolistic transformation of embryogenic grape cell suspensions. *Plant Cell. Reports*, 12, 585-589.

Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. y Mullineaux, P.M. (2000). "pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation", *Plant Mol. Bio.*, 42, 819-832.

Hellens, R., Mullineaux, P. y Klee, H. (2000). "A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors", *Trends in Plant Science*, 5(10), 446-451.

Hellens, R.P., Allan, A.C., Friel, E.N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M.D., Karunairetnam, S., Gleave, A.P. y Laing, W.A. (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods*, 1, 13.

Hidalgo, L. (1993). *Tratado de Viticultura*. Madrid: Mundiprensa.

Hoekma, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. y Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.

Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inzé, D., Engler, G., Villarroel, R., Montau, M. V. y Schell, J. (1980). The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTIC58. *Plasmid*, 3, 212-230.

Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. y Hoekema, A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, 2, 208-218.

Hou, L., Wang, P., Kong, F., Park, H., Kobiro, K. y Ohama, T. (2013). Mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles: A new material for biolistic bombardment. *Phycological Research*, 61, 58-60.

Ibáñez, J., Muñoz-Organero, G., Zinelabidine, L.H., de Andrés, M.T., Cabello, F. y Martínez-Zapater, J.M. (2012). Genetic Origin of the Grapevine Cultivar Tempranillo. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 4.

Iocco, P., Franks, T. y Thomas, M.R. (2001). Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Res.* 10, 105-112.

Jardak-Jamoussi, R., Bouamama. Mliki, A., Ghorbel, A. y Reustle, G. M. (2008). The use of phosphinothricin resistance as selectable marker for genetic transformation of grapevine. *Vitis*, 47, 35-37.

Jelly, D.S., Valat, L., Walter, B. y Maillot, P. (2014). Transient expression assays in grapevine: a step towards genetic improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 1231-1245.

- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. y Bevan, M.W. (1987). "GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants". *The EMBO journal*, 6(13), 3901-7.
- Jin, W., Dong, J., Hu, Y., Lin, Z., Xu, X. y Han, Z. (2009). Improved cold-resistant performance in transgenic grape (*Vitis vinifera* L.) overexpressing cold-inducible transcription factors *AtDREB1b*. *Hort. Sci.*, 44, 35-39.
- Joly, D., Perrin, M., Gertz, C., Kronenberger, J., Demangeat, G. y Masson, J.E. (2004). Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling. *Plant Sci.*, 166, 1427-1436.
- Keller, M. 2010. *The science of grapevines: anatomy and physiology*. Elsevier.
- Kieffer, F., Triouleyre, C., Bertsch, C., Farine, S., Leva, Y. y Walter, B. (2004). Mannose and xylose cannot be used as selectable agents for *Vitis vinifera* L. transformation. *Vitis*, 43, 35-39.
- Kikkert, J.R., Hébert-Soulé, D., Wallace, P.G., Striem, M.J. y Reisch, B.I. (1996). Transgenic plantlets from 'Chancellor' grapevine (*Vitis* sp.) from biolistic transformation of embryogenic cell suspensions. *Plant Cell. Rep.*, 15, 311-316.
- Kikkert, J. R., Ali, G. S., Striem, M. J., Martens, M. H., Wallace, P. G., Molino, L. y Reisch, B. I. (1997). Genetic engineering of grapevine (*Vitis* sp) for enhancement of disease resistance. *Acta Hortic.*, 447, 273-279.
- Kikkert, J. R., Reustle, G. M., Ali, G. S., Wallace, P. G. y Reisch, B. I. (2000). Expression of a fungal chitinase in *Vitis vinifera* L. 'Merlot' and 'Chardonnay' plants produced by biolistic transformation. In: A. Bouquet, J. M. Boursiquot (Eds): Proc. VII Int. Symp. on Grapevine Genetics and Breeding. *Acta Hortic.*, 528, 297-303.
- Kikkert, J.R., Thomas, M.R. y Reisch, B.I. (2001) Grapevine genetic engineering. En: K.A. Roubelakis-Angelakis (Ed). *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine* (pp. 393-410). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Kikkert, J.R., Vidal, J.R. y Reisch, B.I. (2004) Stable plant transformation via particle bombardment and biolistics. En: L. Peña (Ed). *Methods in molecular biology, volume 286, transgenic plant: methods and protocols* (pp. 61-78). Totowa: Humana Press.
- Kikkert, J.K., Striem, M.J., Vidal, J.R., Wallace, P.G., Barnard, J. y Reisch, B.I. (2005) Long-term Study of Somatic Embryogenesis from Anthers and Ovaries of Twelve Grapevine (*Vitis* sp.) genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 41(3), 232-239.
- Kikkert, J. R., Vidal, J. R., Wallace, P. G., Garcia-Zitter, S., Wilcox, W. F., Gadoury, D. M., Seem, R. C., Burr, T. J., Rosenfield, C. L., Samuelian, S. y Reisch, B. I. (2009). Disease Resistance Analyses of Transgenic Grapevines that Contain Endochitinase or Antimicrobial Peptide Genes. *Acta Hortic.*, 827, 379-383.



Köhler, H.A. (1887-1897). *Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuternde*. Franz Eugen Köhler.

Koornneef, M., Elgersma, A., Hanhart, C.J., van Loenen-Martinet, E.P., van Rijn, L. y Zeevaart, J.A.D. (1995). A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.*, 65, 33–39.

Krastanova, S., Balaji, V., Holden, M.R., Sekiya, M., Xue, B., Momol, E.A. y Burr, T.J. (2010) Resistance to crown gall disease in transgenic rootstocks containing truncated *virE2* of *Agrobacterium*. *Transgenic Research.*, 19(6), 949-958.

Krizek, B. (2006). Molecular biology of floral organogenesis. En: B. Jordan (Ed.), *The Molecular Biology of Flowering* (pp. 100-123). King's Lynn: CAB International.

Lazo, G. R., Stein, P. A. y Ludwig, R. A. (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology*, 9, 963-967.

Lee, M.W. y Yang, Y. (2006). Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. En: J. Salinas y J.J. Sanchez-Serrano (Eds.). *Arabidopsis* Protocols (pp. 225–229). New York: Humana Press.

Li, Z.T., Dhekney, Z.T., Dutt, M., Van Aman, M., Tattersall, J., Kelley, K.T. y Gray, D.J. (2006). Optimizing *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42, 220-227.

Li, Z. T., Hopkins, D. L. y Gray, D. J. (2015). Overexpression of antimicrobial lytic peptides protects grapevine from Pierce's disease under greenhouse but not field conditions. *Transgenic Res.*, 24, 821-836.

Lindsey, K. y Jones, M.G.K. (1989). Plant biotechnology in agricultura, Open University Press, Wiley, Chinchester, p 59.

Liu, F., Gong, D.P., Zhang, Q., Wang, D.W., Cui, M.M., Zhang, Z.G., Liu, G.S., Wu, J.X. y Wang, Y.Y. (2015). High-throughput generation of an activation-tagged mutant library for functional genomic analyses in tobacco. *Planta*, 241(3), 629-640.

Lloyd, G. y McCown, B.H. (1981). Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30, 421-427.

López-perez, A.J., Carreno, J. y Dabauza, M. (2006). Somatic embryo germination and plant regeneration of three grapevine cvs: Effect of IAA, GA(3) and embryo morphology. *Vitis*, 45(3), 141-143.

López-Pérez, A.J., Velasco, L., Pazos-Navarro, M. y Dabauza, M. (2008). Development of highly efficient genetic transformation protocols for table grape Sagraone and Crimson Seedless at low *Agrobacterium* density. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.*, 94, 189-199.

- Mackay, I. (2007). *Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. Norfolk, England: Caister Academic Press. p. 440.
- Mandel, M. y Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.*, 53(1), 159-62.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. y Yanofsky, M.F. (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature*, 360, 273-277.
- Martin-Ortigosa, S., Valenstein, J.S., Sun, W., Moeller, L., Fang, N., Trewyn, B.G., Lin, V.S. y Wang, K. (2012). Parameters affecting the efficient delivery of mesoporous silica nanoparticle materials and gold nanorods into plant tissues by the biolistic method. *Small*, 8(3), 413-422.
- Martinelli, L., Buzkan, N., Minafra, A., Saldarelli, P., Costa, D., Poletti, V., Festi, S., Perl, A. y Martelli, G. P. (1998). Genetic transformation of grape for resistance to virus related to the rugose wood disease complex. Résumé VIIème Symp. Int. sur la Génétique et l'Amélioration de la Vigne, Montpellier, France.
- Martinelli, L., Gribaudo, I., Bertoldi, D., Candiooli, E. y Poletti, V. (2001). High efficiency somatic embryogenesis and plant germination in grapevine cultivars Chardonnay and Brachetto a grappolo lungo. *Vitis*, 40, 111-115.
- Martínez, C.H., Nuñez-Pérez, M., Maceira, V.X., Leiro, L.D. y Daporta, P.M. (1999). *A vide e o vinho. Enciclopedia temática ilustrada*. Vigo: A Nosa Terra.
- Martínez-Zapater, J.M., Carmona, M.J., Díaz-Riquelme, J., Fernández, L. y Lijavetzky, D. (2010). Grapevine genetics after the genome seugence: Challenges and limitations. Grapevine genetics. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 33-46.
- Martinelli, L., Bragagna, P., Poletti, V. y Scienza, A. (1993). Somatic embryogenesis from leaf- and petiole-derived callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell. Rep.*, 12, 207-210.
- Mauro, M. C., Toutain, S., Walter, B., Pinck, L., Otten, L., Coutos-Thevenot, P., Deloire, A. y Barbier, P. (1995). High efficiency regeneration o grapevine plants transformed with the GFLV coat protein. *Plant Sci.*, 112, 97-106.
- Mauro, M.C., Coutos-Thevenot, P., Boulay, M., Barbier, P., Walter, B., Valat, L. y Pinck, L. (2000). Analysis of 41 B (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri*) grapevine rootstocks for grapevine fanleaf virus resistance. *Acta Horticulturae*, 528, 313-319.
- Matthew, L. (2004) RNAi for plant functional genomics. *Comparative and Funtional Genomics*, 5, 240-244.
- May, P. (2004). Development after fertilisation. En P. May (Ed.), *Flowering and Fruitset in Grapevines* (pp. 63-72). Adelaide: Lythrum Press.



Meneghetti, S., Gardiman, M., y Calo, A. (2006). Flower biology of grapevine. A review. *Adv. Hortic. Sci.*, 20, 317-325.

Mezzetti, B., Landi, L., Scortichini, L., Rebori, A., Spena, A. y Pandiolfini, T. (2002). Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in strawberry. *Acta Hortic.*, 567, 101-104.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España. <http://www.magrama.gob.es>

Molholt, J. D. (1978). Increased transformation frequency in *E. coli*. *Biochemical and biophysical Research Communication*, 82(2), 477-483.

Mukherjee, P., Husain, N., Misra, S.C. y Rao, V.S. (2010). *In vitro* propagation of a grape rootstock, deGrasset (*Vitis champinii* Planch.): Effects of medium composition and plant growth regulators. *Scientia Horticulturae.*, 126, 13-19.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51(1), 263-273.

Mullins, M.G., Tang, F.C.A. y Facciotti, D. (1990): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines: Transgenic plant of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. *Biotechnology*, 8, 1041-1045.

Mullins, M.G., A. Bouquet, y L.E. Williams. (1992). *Biology of the Grapevine*. Cambridge: Cambridge University Press.

Murashige, T y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

Nakano, M., Hoshino, Y. y Mii, M. (1994). Regeneration of transgenic plants of grapevine (*Vitis vinifera* L.) via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of embryogenic calli. *Journal of Experimental Botany*, 45(274), 649-656.

Neff, M.M., Neff, J.D., Chory, J., Pepper, A.E. (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphism: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant Journal*, 14(3), 387-392.

Nirala, N.K., Das, D.K., Srivastava, P.S., Sopory, S.K. y Upadhyaya, K.C. (2010). Expression of a rice chitinase gene enhances antifungal potential in transgenic grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* 49(4), 181-187.

Nitsch, J.P. y Nitsch, C. (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*, 169, 85.

Nookaraju, A. y Agrawal, D. C. (2012). Enhanced tolerance of transgenic grapevines expressing *chitinase* and  $\beta$ -1,3-*glucanase* genes to downy mildew. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 111, 15-28.

Ogunkanmi, A.L., Oboh, B., Onifade, B., Ogunjobi, A.A., Taiwo, I.A. y Ogundipe, O.T. (2008). An improved method of extracting genomic DNA from preserved tissues of *Capsicum annuum* for PCR amplification. *EurAsia J. BioSci.*, 2, 115–119-P.

Paylan, I.C., Çandar, A., Gümüş, M., Pazarlar, S. y Önder, S. (2014). Comparison of six total RNA isolation methods for diagnosis of GYSVD-1 (Grapevine Yellow Speckle Viroid-1) on *Vitis vinifera* L. leaves. *Pak. J. Bot.*, 46(6), 2089-2093.

Péros, J.P., Torregrosa, L. y Berger, G. (1998). Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. *Journal of Experimental Botany*, 49(319), 171-179.

Perrin, M., Gertz, C. y Masson, J.E. (2004). High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Science*, 167, 1343-1349.

Perrone, I., Gambino, G., Chitarra, W., Vitali, M., Pagliarani, C., Ricomagno, N., Balestrini, R., Kaldenhoff, R., Uehlein, N., Gribaudo, I., Schubert, A. y Lovisolo, C. (2012). The grapevine root-specific aquaporin *VvPIP2;4N* controls root hydraulic conductance and leaf gas exchange under well-watered conditions but not under water stress. *Plant Physiol.*, 160, 965-977.

Perl, A., Lotan, O., Abu-Abied, M. y Holland, D. (1996). Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nat. Biotechnol.*, 14, 624-628.

Petrie, P.R. y Clingeleffer, P.R. (2005). Effects of temperature and light (before and after budburst) on inflorescence morphology and flower number of Chardonnay grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.*, 11, 59-65.

pGreen on the web. (<http://www.pgreen.ac.uk>)

Poupin, M.J., Federici, F., Medina, C., Matus, J.T., Timmermann, T. y Arce-Johnson, P. (2007). Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box *TM6*, *PISTILLATA* and *APETALA3* genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene*, 404(1-2), 10-24.

Prado, M.J., Grueiro, M.P., González, M.V., Testillano, P.S., Domínguez, C., López, M. y Rey, M. (2010). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). *Scientia Horticulturae*, 125, 342-352.

Prelich, G. (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, 190, 841–854.

Reustle, G.M., Wallbraun, M., Zwiebel, M., Wolf, R., Manthey, T., Burkhardt, C., Lerm, T., Vivier, M. y Krczal, G. (2003). Selectable marker systems for genetic engineering of grapevine. *Acta Hort.*, 603, 485-490.

Reustle, G.M. y Buchholz, G. (2009). Recent trends in grapevine genetic engineering. En C. Roubelakis-angelakis (Ed.), *Grapevine Molecular physiology & biotechnology*, (pp. 495-508). Dordrechts: Kluwer Academic Publishers.

Rezadoost, M.H., Kordrostami, M. y Kumlhe, H.H. (2016). An efficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants. *3 Biotech*, 6, 61-68.

Rojas, B., Paroschy, J. H. y McKersie, B. D. (1997). Genetic transformation of grapevines for increased freezing tolerance. *In Vitro Cellular Develop. Biol.*, 33 (part II): 68A.

Rosenfield, C.L., Samuelian, S., Vidal, J.R. y Reisch, B.I. (2010). Transgenic disease resistance in *Vitis vinifera*: Potential use and screening of antimicrobial peptides. *Am. J. Enol. Vitic.*, 61(3), 348-357.

Rubio, J., Montes, C., Castro, A., Álvarez, C., Olmedo, B., Muñoz, M., Tapia, E., Reyes, F., Ortega, M., Sánchez, E., Miccono, M., Dalla Costa, L., Martinelli, L., Malnoy, M. y Prieto, H. (2015). Genetically engineered Thompson Seedless grapevine plants designed for fungal tolerance: selection and characterization of the best performing individuals in a field trial. *Trans. Res.*, 24, 43-60.

Russell, J.A., Roy, M.K. y Sanford, J.C. (1992). Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol.*, 98, 1050-1056.

Ryder, M. H., Tate, M. E. y Kerr, A. (1985). Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surfaces of carrot root discs. *Plant Physiol.*, 77, 215-221.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D. y Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Journal of Particulate Science and Technology*, 5, 27-37.

Sanford, J.C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, 79, 206-209.

Sanford, J.C., Smith, F.D. y Russell, J.A. (1993). Optimizing the biolistic process. *Methods in Enzymology*, 217, 483-509.

San Pedro, T., Peiro, R., Jiménez, C., Olmos, A. y Gisbert, C. (2017). Evaluation of conditions for *in vitro* storage of commercial and minor grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1-7.

- San Pedro, T., Gammoudi, N., Peiro, R., Olmos, A. y Gisbert, C. (2018). Somatic embryogenesis from seeds in a broad range of *Vitis vinifera* L. varieties: Rescue of true-to-type virus-free plants. *BMC Plant Biology*, 17, 216.
- Saporta, R., De la Torre, F., Segura, A. y Vidal, J.R. (2014). Toxic effect of antibiotics in grapevine (*Vitis vinifera* 'Albariño') for embryo emergente and transgenic plant regeneration from embryogenic cell suspension. *Vitis*, 53(2), 89-94.
- Saporta, R., San Pedro, T. y Gisbert, C. (2016). Attempts at grapevine (*Vitis vinifera* L.) breeding through genetic transformation: The main limiting factors. *Vitis*, 55, 173-186.
- Scorza, R., Cordts, J.M., Ramming, D.W. y Emershad, R.L. (1995). Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 14, 589-592.
- Scorza, R., Cordts, J. M., Gray, D. J., Gonsalves, D., Emershad, R. L. y Ramming, D. W. (1996). Producing transgenic 'Thompson Seedless' grape (*Vitis vinifera* L.) plants. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 121, 616-619.
- Schroth, M.N., Thompson, J.P. y Hildebran, D.C. (1965). Isolation of *Agrobacterium tumefaciens*- *A. radiobacter* group from soil. *Phytopathology*, 55, 645-647.
- Small, I. (2007) RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Curr.Opin. Biotech.*, 18, 148-153.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
- Sreekantan, L., Torregrosa, L., Fernandez, L. y Thomas, M.R. (2006). VvMADS9, a class B MADS-box gene involved in grapevine flowering, shows different expression patterns in mutants with abnormal petal and stamen structures. *Funct. Plant Biol.*, 33, 877-886.
- Srinivasan, C. y Mullins M.G. (1978). Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). Formation of inflorescences in vitro by isolated tendrils. *Plant Physiol.*, 61, 127-130.
- Tattersall, E.A.R., Ergul, A., AlKayal, F., DeLuc, L., Cushman, J.C. y Cramer, G.R. (2005). Comparison of methods for isolating high-quality RNA from leaves of grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 68, 4.
- Tesnière, C., Torregrosa, L., Pradal, M., Souquet, J., Gilles, C., Santos, J. D., Chatelet, P. y Gutana, Z. (2006). Effects of genetic manipulation of alcohol deshydrogenase levels on the response to stress and the synthesis of secondary metabolites in grapevines leaves. *J. Exp. Bot.*, 57, 91-99.
- Thomas, M. y Scott, N. (2001). PR-142: Evaluation of transgenes in grapevine No. 2.
- Torregrosa, L. (1998). A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis*, 37, 91-92.

Torregrosa, L., López, G. y Bouquet, A. (2000). Antibiotic sensitivity of Grapevine: A comparison between the effect of Hygromycin and Kanamycin on shoot development of transgenic 110 Richter rootstock (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*). *S. Afr. J. Enol. Vitic*, 21(1), 32-39.

Torregrosa, L., Iocco, P. y Thomas, M.R. (2002). Influence of *Agrobacterium* strain, culture medium and cultivar on the transformation efficiency of *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 183-190.

Torregrosa, L., Verriès, C. y Tesnière, C. (2002b) Grapevine (*Vitis vinifera* L.) promoter analysis by biolistic-mediated transient transformation of cell suspensions. *Vitis*, 41, 27–32.

Torregrosa, L., Violet, S., Adivèze, A., Iocco-Corena, P. y Thomas, M.R. (2015). *Agrobacterium* Protocols: Volume 2, Grapevine (*Vitis vinifera* L.). En K. Wang (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 1224 (pp. 177-194).

Tsvetkov, I., Tsoleva, V. y Atanasov, A. (2009). Gene transfer for stress resistance in grapes. *Acta Hort.*, 528, 389-394.

Tzfira, T. y Citovsky, V. (2002). Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends in Cell Biology*, 12(3), 121-129.

Ueki, S., Lacroix, B., Krichevsky, A., Lazarowitz, S. y Citovsky, V. (2008). Functional transient genetic transformation of Arabidopsis leaves by biolistic bombardment. *Nature Protocols*, 4(1), 71-77.

Valpuesta, V. (2002). Tools of genetic engineering in plants. En V. Valpuesta (Ed.), *Fruits and vegetable biotechnology*. Cambridge: CRC Press LLC.

Vasconcelos, M.C., Greven, M., Winfield, C.S., Trought, M.C.T. y Raw, V. (2009). The flowering process of *Vitis vinifera*: A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 60, 4.

Vergara, R., Noriega, X., Parada, F., Dantas, D. y Pérez, F.J. (2016). Relationship between endodormancy, *FLOWERING LOCUS T* and cell cycle genes in *Vitis vinifera*. *Planta*, 243(2), 411-419.

Vidal, J.R., Kikkert, J.R., Wallace, P.G. y Reisch, B.I. (2003). High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) containing *npt-II* and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Rep.*, 22, 252-260.

Vidal, J.R., Kikkert, J.R., Donzelli, B.D., Wallace, P.G. y Reisch, B.I. (2006). Biolistic transformation of grapevine using minimal gene cassette technology. *Plant Cell Reports*, 25, 807-814.



Vidal, J.R., Rama, J., Taboada, L., Martín, C., Ibáñez, M., Segura, A. y González-Benito, M.E. (2009). Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant Cell Tiss. Org.*, 96, 85-94.

Vidal, J.R., Gomez, C., Cutanda, M.C., Shrestha, B.R., Bouquet, A., Thomas, M.R. y Torregrosa, L. (2010). Use of gene transfer technology for functional studies in grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 138-151.

Vila Fariña, X.L. (2010). *A orixe histórica do viño Albariño*. Ediciones Cardedoso.

Walden, R. y Schell, J. (1990). Techniques in plant molecular biology-progress and problems. *Eur. J. Biochem.*, 192, 563-576.

Wang, Q., Gafny, R., Sahar, N., Sela, I., Mawassi, M., Tanne, E. y Perl, A. (2002). Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspension by encapsulation-desiccation and subsequent plant regeneration. *Plant Science*, 162, 551-558.

Wang, Q., Li, P., Hanania, U., Sahar, N., Mawassi, M., Gafny, R., Sela, I., Tanne, E. y Perl, A. (2005). Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency and transgenic plant regeneration of *Vitis vinifera* L. by optimizing selection regimes and utilizing cryopreserved cell suspensions. *Plant Science*, 168, 565-571.

Wang, L., Xie, X., Yao, W., Wang, J., Ma, F., Wang, C., Yang, Y., Tong, W., Zhang, J., Xu, Y., Wang, X., Zhang, C. y Wang, Y. (2017). RING-H2-type E3 gene *VpRH2* from *Vitis pseudoreticulata* improves resistance to powdery mildew by interacting with *VpGRP2A*. *Journal of Experimental Botany* 68 (7), 1669-1687.

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. (2004). *Molecular Biology of the Gene (Fifth edition edición)*. San Francisco: Benjamin Cummings.

Watson, M.R., Lin, Y., Hollwey, E., Dodds, R.E., Meyer, P. y McDowall, K.J. (2016). An improved binary vector and *Escherichia coli* strain for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation. *G3-Genes Gen. Gene.*, 6 (7), 2195-2201.

Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F. y Meyerowitz, E.M. (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 69, 843-859.

Yamamoto, T., Iketani, H., Ieki, H., Nishizawa, Y., Notsuka, K., Hibi, T., Hayashi, T. y Matsuda, N. (2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.*, 19, 639-646.

Yang, Y., Jittayasothorn, Y., Chronis, D., Wang, X., Cousins, P. y Zhong, G. Y. (2013). Molecular characteristics and efficacy of *16D10* siRNAs in inhibiting Root-Knot nematode infection in transgenic grape hairy roots. *Plos One*, 8, e69463.

Yoo, S.K., Chung, K.S., Kim, J., Lee, J.H., Hong, S.M., Yoo, S.J., Yoo, S.Y., Lee, J.S. y Ahn, J.H. (2005). *CONSTANS* activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF*

*CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139, 770–778.

Zhijian, T.L., Dhekney, S.A., Dutt, M. y Gray, D.J. (2008). An improved protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Tiss. Org.*, 93, 311-321.

Zhou, Q., Dai, L., Cheng, S., He, J., Wang, D., Zhang, J. y Wang, Y. (2014). A circulatory system useful both for long-term somatic embryogenesis and genetic transformation in *Vitis vinifera* L. cv. 'Thompson Seedless'. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 118, 157-168.









## **ANEXOS**



## **9. ANEXOS**

### **Anexo 1: Soluciones Stock y medios de cultivo**

#### **Anexo 1.1 Preparación de soluciones Stocks**

##### **1.1.1. Glutamina (250 mL a 25 gL<sup>-1</sup>)**

Autoclavar una botella de 500 mL con anterioridad.

Pesar 6,25 g de Glutamina.

Llevar a un matraz de 250 mL con 200 mL de agua destilada.

Disolver.

Ajustar el pH a 5,7.

Enrasar a 250 mL.

Filtrar en cabina de flujo con una jeringa y con filtro (0,2 micras) estériles en la botella estéril.

Guardar en la nevera.

##### **1.1.2. BAP (1mM)**

Pesar 22,53 mg.

Diluir en 2mL de NaOH 1N.

Diluir la solución anterior en agua destilada en un vaso de precipitados y poner en agitación.

Enrasar en matraz aforado de 100 mL.

Filtrar en cabina de flujo con una jeringa y con filtro (0,2 micras) estériles en tubos Eppendorf de 1,5 mL.

Guardar en la nevera.

##### **1.1.3. 2,4-D (1mM)**

Pesar 22,1 mg.

Diluir con 2 mL de NaOH 1N.

Diluir en agua destilada en un vaso de precipitados y ponerlo en agitación.

Enrasar en matraz aforado de 100 mL.

Filtrar en cabina de flujo con una jeringa y con filtro (0,2 micras) estériles en tubos Eppendorf de 1,5 mL.

Guardar en la nevera.

##### **1.1.4. NOA (1mM)**

Pesar 20,2 mg.

Diluir en 2 mL de NaOH 1N.

Diluir en agua destilada en un vaso de precipitados y dejar en agitación.

Volver a poner en otro vaso de precipitados y dejar en agitación 1 hora.

Enrasar en matraz aforado de 100 mL.

Filtrar en cabina de flujo con una jeringa y con filtro (0,2 micras) estériles en tubos Falcon de 50 mL estériles.

Guardar en la nevera.

#### 1.1.5. 4-CPPU (1mM)

Pesar 49,6 mg.

Diluir en 10 mL de DMSO dentro de la campana de extracción de gases.

Poner en un tubo Falcon de 50 mL estéril en la cabina de flujo laminar.

Guardar en la nevera (se cristalizará).

#### 1.1.6. Solución GUS

Para 200 mL:

- 150 mL Agua Milli-Q
- 0,744 g EDTA disodium salt dihydrate
- 1,76 g Sodium phosphate monobasic
- 0,042 g Potassium ferrocyaide
- 0,2 mL Triton-X

Ajustar el volumen a 180 mL

Ajustar el pH a 7,0

- Disolver 100 mg de 5-bromo, 3 indolyl  $\beta$ -D-glucuronic acid (X-Gluc)\* en 2 mL de DMSO.

\*También llamado X-GlcA, cyclohexiammonium.

- Mezclar los 2 mL con la solución del principio.
- Ajustar el volumen a 200 mL.
- Filtrar en cabina de flujo con una jeringa y con filtro (0,2 micras) estériles en tubos Eppendorf de 1,5 mL.
- Guardar en congelador a -20 °C

## **Anexo 1.2 Medios de cultivo.**

Los medios de cultivo se han de esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 atm durante 20 minutos. Los reguladores de crecimiento se añaden al medio después del autoclavado y cuando la temperatura este por debajo de los 65 °C.

### **1.2.1 Medio MS.**

- Sales Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas (Duchefa) 4,3 gL<sup>-1</sup>.
- Sacarosa 20 gL<sup>-1</sup>
- pH 5.8 KOH
- Phytigel 2,5 gL<sup>-1</sup>

### **1.2.2 Medio WP.**

- Sales Lloyd y McCown Woody Plant (Lloyd y McCown, 1981) con vitaminas (Duchefa) 2,4 gL<sup>-1</sup>
- Sacarosa 20 gL<sup>-1</sup>
- pH 5.8 KOH
- Phytigel 2,5 gL<sup>-1</sup>

### **1.2.3 Medio MSE (MS Embriogénesis).**

- Sales Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas (Duchefa) 4,3 gL<sup>-1</sup>.
- Sacarosa 20 gL<sup>-1</sup>
- Reguladores de crecimiento: BAP 4,4 µM, 2,4-D 4,5 µM
- pH 5.8 KOH
- Phytigel 2,5 gL<sup>-1</sup>

### **1.2.4 Medio NNE (NN Embriogénesis).**

- Sales Nitsch y Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969) (Duchefa) 2,1 gL<sup>-1</sup>
- Vitaminas MS 1000x
- Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup>
- Glutamina 0,5 gL<sup>-1</sup>
- Reguladores de crecimiento: 2,4-D 2,5 µM, NOA 2,5 µM, 4-CPPU 5 µM
- pH 5,8 KOH
- Phytigel 2,5 gL<sup>-1</sup>

### **1.2.5 Medio LB (Bertani, 1951).**

- Triptona 10 gL<sup>-1</sup>
- NaCl 10 gL<sup>-1</sup>
- Extracto de levadura 5 gL<sup>-1</sup>
- Micro agar 10 gL<sup>-1</sup>

### **1.2.6 Medio MS/2CA.**

- Sales Murashige y Skoog con vitaminas (Duchefa) 2,2 gL<sup>-1</sup>
- Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup>
- Carbón activo 3 gL<sup>-1</sup>
- pH 5,8 KOH



- Phytigel 2,5 gL<sup>-1</sup>

#### **1.2.7 Medio GS1CA (Franks *et al.* 1998).**

- Sales Murashige y Skoog con vitaminas (Duchefa) 2,2 gL<sup>-1</sup>
- Sacarosa 60 gL<sup>-1</sup>
- Carbón activo 2,5 gL<sup>-1</sup>
- Reguladores de crecimiento: NOA 5 µM, BAP 1 µM
- pH 6,5 KOH
- Micro agar 10 gL<sup>-1</sup>

#### **1.2.8 Medio C<sup>1</sup>P (Torregrosa, 1998).**

- Sales Murashige y Skoog con vitaminas (Duchefa) 2,2 gL<sup>-1</sup>
- Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup>
- Hidrolizado de caseína 1 gL<sup>-1</sup>
- Reguladores de crecimiento: BAP 1 µM, 2,4-D 5 µM.
- pH 6,5 KOH
- Phytigel 2,5 gL<sup>-1</sup>

#### **1.2.9 Medio GM+NOA.**

- Sales Murashige y Skoog con vitaminas (Duchefa) 4,3 gL<sup>-1</sup>
- Glicerol 4,6 gL<sup>-1</sup>
- Maltosa 18 gL<sup>-1</sup>
- Reguladores de crecimiento: NOA 5 µM

#### **1.2.10 Medio MS/2 OSRED.**

- Sales Murashige y Skoog con vitaminas (Duchefa) 2,2 gL<sup>-1</sup>
- Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup>
- pH 5.8
- Phytigel 2,5 gL<sup>-1</sup>
- La diferencia entre OSRED 10 y OSRED 20 es el volumen en mL que habrá en las placas.

#### **1.2.11 Medio PAGAR (MS/2 Paper Agar).**

- Sales Murashige y Skoog con vitaminas (Duchefa) 2,2 gL<sup>-1</sup>
- Manitol 22,7 gL<sup>-1</sup>
- Sorbitol 22,7 gL<sup>-1</sup>
- Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup>
- pH 5,8
- Phytigel 2,5 gL<sup>-1</sup>
- Dispensar en placas estériles que contengan un papel de filtro estéril (el papel de filtro deberá llevar una pestañita de cinta para poder manipular más tarde el medio entero con las pinzas)

#### **1.2.12 Medio mantenimiento de vid WP.**

- Sales Lloyd y McCown Woody Plant con vitaminas (Duchefa) 2,4 gL<sup>-1</sup>
- Sacarosa 20 gL<sup>-1</sup>
- Reguladores de crecimiento: IBA 0,1 µM.
- Pirrolidona polivinilo (PVP) 100 mgL<sup>-1</sup>

- pH 5,8
- Plant Agar 7 gL<sup>-1</sup>

### 1.2.13 Medio MS/2.

- Sales Murashige y Skoog con vitaminas (Duchefa) 2,2 gL<sup>-1</sup>
- Sacarosa 30 gL<sup>-1</sup>
- pH 5,8
- Phytigel 2,5 gL<sup>-1</sup>

## Anexo 1.3 Programas de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

### Anexo 1.3.1 – Programa de PCR con AmpliTaq Gold Polimerasa de Thermo Fisher® (25 µL de volumen de reacción).

	[i]	[f]	1 muestra (µL)
<b>Agua</b>	-	-	13,8
<b>Buffer</b>	10x	1x	2,5
<b>Cl<sub>2</sub>Mg</b>	25 mM	2 mM	2
<b>dNTPs</b>	10 mM	200 µM	0,5
<b>Cebador 5'</b>	10 µM	0'2 µM	0,5
<b>Cebador 3'</b>	10 µM	0'2 µM	0,5
<b>Taq Gold</b>	5 uµL <sup>-1</sup>	1 uµL <sup>-1</sup>	0,2
<b>DNA</b>	-	-	5

Paso	Temp. °C	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	10 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94	1 seg	35
<b>Annealing</b>	X	30 seg	
<b>Extensión</b>	72	1 seg	
<b>Extensión final</b>	72	10 min	1
	4	Hold	

### Anexo 1.3.2 – Programa de PCR con el kit de Thermo Fisher® Phire Plant Direct PCR Kit (23 µL).

	[i]	[f]	1 muestra (µL)
<b>Agua</b>	-	-	7,6
<b>Buffer</b>	2x	1x	10
<b>Cebador 5'</b>	10 µM	0,5 µM	1
<b>Cebador 3'</b>	10 µM	0,5 µM	1
<b>Phire DNA polymerase</b>	-	-	0,4
<b>DNA</b>	-	-	3

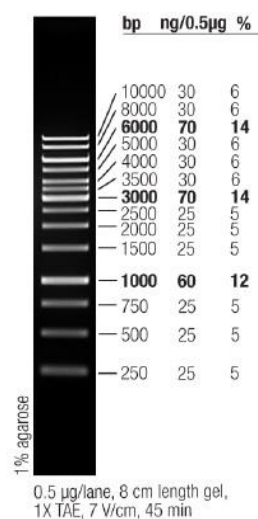
Paso	Temp. °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	5 min	1
Desnaturalización	98	5 seg	40
Annealing	X	5 seg	
Extensión	72	20 seg	
Extensión final	72	1 min	1
	4	Hold	

### Anexo 1.3.3. Programa utilizado para a PCR con la enzima PWO Polimerasa.

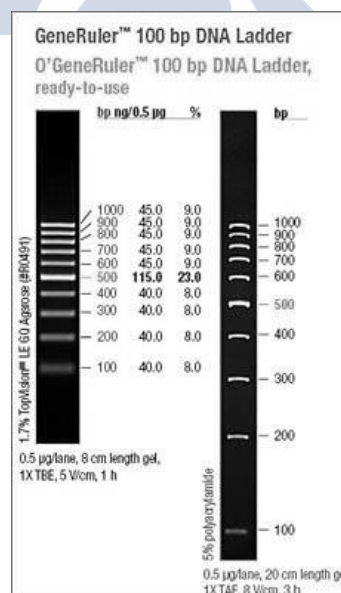
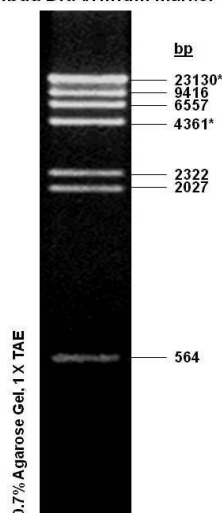
	Grados (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	2'	1
Annealing	94	15''	10
	45-65	30''	
longación	72	1'30''	
Annealing	94	15''	20
	45-65	30''	
Elongación	72	1'30''+ 5''/ciclo	
Extensión final	72	7'	1
Final	4	∞	-

### Anexo 1.3.4: Marcadores de peso molecular.

GeneRuler 1 kb DNA Ladder

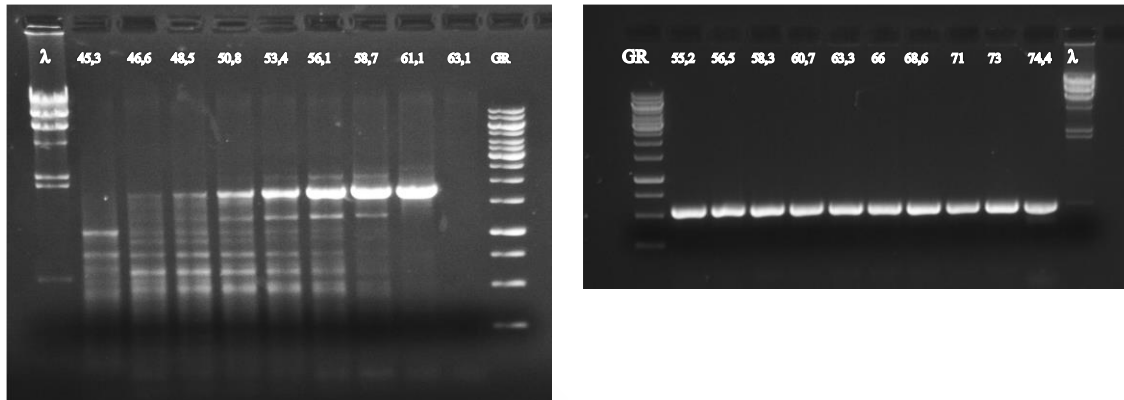


Lambda DNA/HindIII Marker



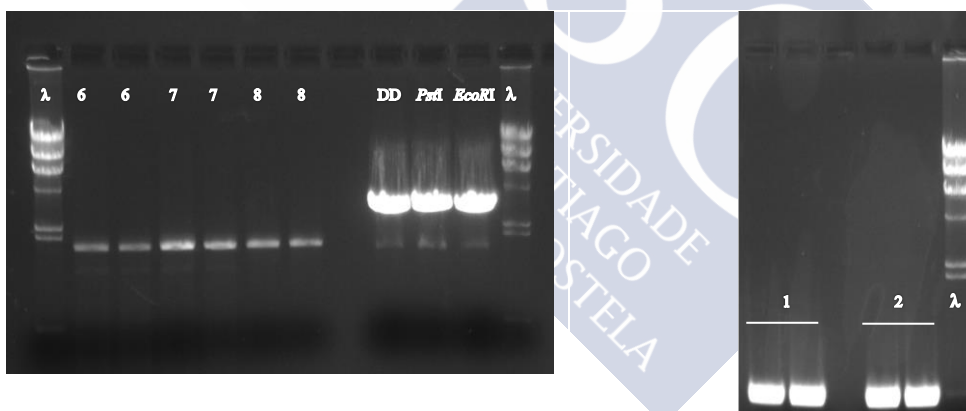
## Anexo 2. Visualización de los geles de electroforesis.

### Anexo 2.1: Visualización de los gradientes de temperatura para la enzima PWO Polimerasa.



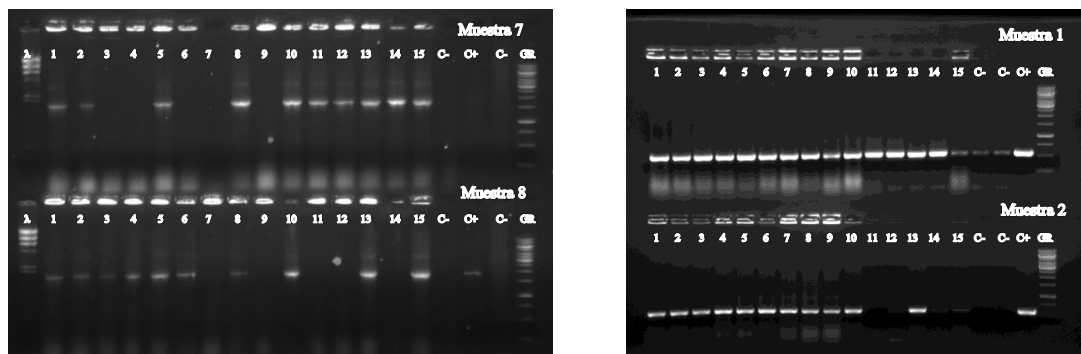
Anexo 2.1: Izquierda: Visualización de los productos de PCR del gradiente de temperatura (en °C) de la enzima PWO para el gen *Vvgai*. Derecha: para el gen *VvFT*. Los marcadores de peso utilizados fueron el  $\lambda$ HindIII( $\lambda$ ) y GeneRuler 1Kb (GR).

### Anexo 2.2: Visualización de los geles tras la electroforesis de las digestiones de los genes de interés y los plásmidos.



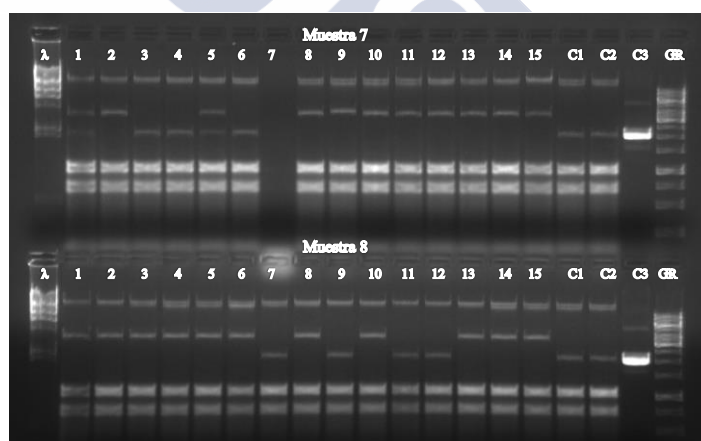
Anexo 2.2: Visualización de los geles con las digestiones de *Vvgai* y pJit60 (izquierda) y *VvFT* (derecha), con los enzimas de restricción *Eco*RI y *Pst*I. El marcador de pesomolecular fue el  $\lambda$ HindIII( $\lambda$ ).

**Anexo 2.3: Visualización de los geles tras la electroforesis de las colonias transformadas para los genes de floración.**



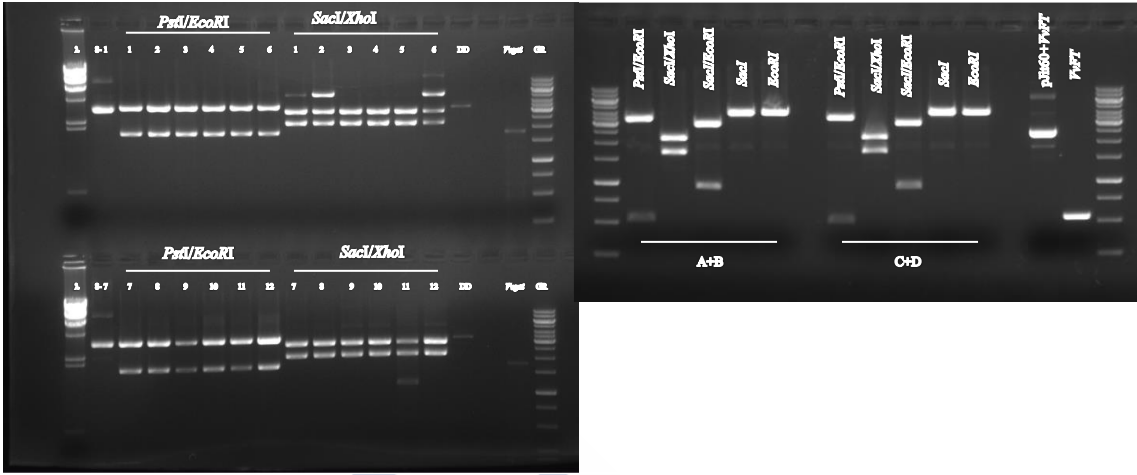
Anexo 2.3: Visualización de las colonias transformadas con *Vvgai* (izquierda) y *VvFT* (derecha). Como marcadores de peso se utilizaron el  $\lambda$ HindIII( $\lambda$ ) y el GeneRuler 1 Kb(GR)

**Anexo 2.4: Visualización del gel para el screening por tamaño de las colonias *Vvgai*.**



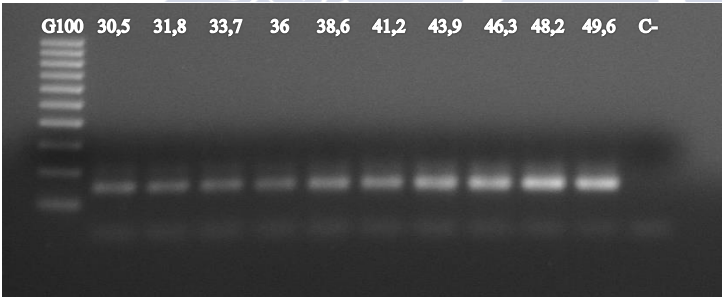
Anexo 2.4: Visualización del screening por tamaño de las colonias *Vvgai*. C1: Bacteria con pJit60; C2: Bacteria ligación de PstI; C3: pJit60. Marcadores de peso  $\lambda$ HindIII( $\lambda$ ) y GeneRuler 1Kb(GR).

**Anexo 2.5: Visualización de las digestiones del plásmido pGreenII 179 con los genes de floración.**



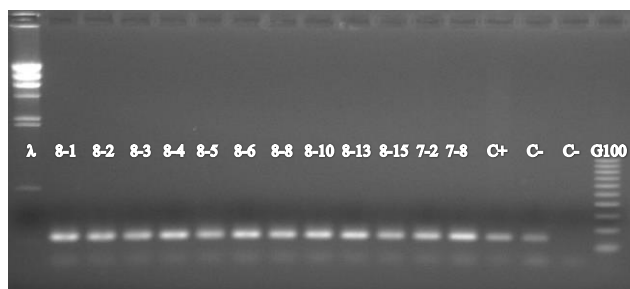
Anexo 2.5: Visualización de las digestiones del plásmido pGreenII 179 con los genes *Vvgai* (izquierda) y *VvFT* (derecha). Como marcadores de peso molecular se han utilizado el  $\lambda$ HindIII( $\lambda$ ) y el GeneRuler 1kb(GR).

**Anexo 2.6: Visualización de los productos de PCR del gradiente de temperaturas para *XhoI*:CAPS.**



Anexo 2.6: Visualización del gradiente de temperaturas (en °C) *XhoI*:CAPS. Marcador de peso GeneRuler 100 Bp. (G100)

## Anexo 2.7: Visualización de los productos de PCR tras la amplificación de las colonias con los cebadores dCAPS.



Anexo 2.7: Visualización de la amplificación de las colonias con los cebadores dCAPS con una temperatura de hibridación de 50 °C. Marcador de peso GeneRuler 100 Bp (G100)

## Anexo 3. Protocolos de transformación.

### Anexo 3.1: Protocolo de obtención de células competentes y transformación de *A. tumefaciens* mediante electroporación.

#### Obtención de células competentes

Material necesario: Colonias de la cepa EHA105, tubos Falcon, agua estéril, glicerol al 10% estéril, tubos Eppendorf, hielo, nitrógeno líquido y una centrífuga.

- En primer lugar, es necesario que todo el material esté en hielo. Es importante trabajar en condiciones de frío. Se prepara la centrífuga a 4 °C, 5000 rpm y el temporizador en 5 minutos.
- Se centrifugaron las bacterias que se colocaron la noche anterior a crecer en medio LB con rifampicina y se retiró el sobrenadante.
- A continuación, se realizó un lavado con 25 mL de agua estéril. Este lavado es importante para eliminar las sales y así evitar un arco eléctrico durante la electroporación. Tras hacerlo se centrifuga. Este paso se repitió 5 veces variando el volumen y entre fase y fase se resuspendió el precipitado con un poco de agua estéril. Los dos primeros lavados se realizaron con 25 mL, los dos siguientes con 12 mL y el último lavado con 7 mL.
- Se eliminó el sobrenadante tras centrifugar el último tubo, se puso 2 mL de glicerol al 10% frío (4 °C) y se resuspendió el precipitado.
- Para finalizar el protocolo de obtención de células competentes, se repartieron 50 µL en tubos Eppendorf de 1,5 mL, se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron en congelador a -80 °C.

#### Transformación mediante la electroporación:

- Antes de comenzar se prepararon las soluciones *stock* de los plásmidos a 50 ngµL<sup>-1</sup> (se prepararon tantos tubos Eppendorf de 1,5 mL como construcciones). En este caso fueron 6 construcciones, pGreen29, pGreen29+VvFT, pGreen29+Vvgai, pGreen179, pGreen179+VvFT y pGreen179+Vvgai y se mantiene en hielo. Se puso 1 mL de medio LB en cada tubo.
- También se prepararon placas de medio LB sólido con los tres agentes de selección: rifampicina para seleccionar la cepa EHA105 (25 µgµL<sup>-1</sup>), kanamicina



para seleccionar los plásmidos pGreen ( $50 \mu\text{gL}^{-1}$ ) y tetraciclina para seleccionar al pSoup ( $10 \mu\text{gL}^{-1}$ ).

- En los tubos con las bacterias electrocompetentes se puso  $1 \mu\text{L}$  de un plásmido y  $1 \mu\text{L}$  de pSoup y se agitó hasta descongelar. Posteriormente el volumen de los tubos se colocó dentro de las cubetas de electroporación (Bio-Rad) enfriadas en hielo. Estas cubetas se colocaron en el electroporador (Bio-Rad) y se les aplicó un pulso eléctrico (campo de fuerza =  $2.5 \text{ kVcm}^{-1}$ , capacitancia =  $25 \text{ mF}$ , resistencia =  $400 \text{ W}$  y pulso eléctrico de 8-12 mS). Se recuperó la suspensión bacteriana y se puso en los tubos con medio LB. Se dejó en agitación durante un máximo de 2 horas a  $30^\circ\text{C}$ . Pasado ese tiempo, se repartieron  $100 \mu\text{L}$  en una placa de medio LB sólido con los agentes selectivos y se dejó crecer a  $30^\circ\text{C}$  durante 3 días. Tras esos días, se seleccionaron las bacterias portadoras de los plásmidos de interés realizando una PCR y visualizando los productos de amplificación correspondientes a los genes *VvFT*, para el *Vvgai* (ver apartado 5.3.2.2).
- Así pues, tras la selección bacteriana, se procedió a terminar este proceso realizando unos *stocks* de glicerol de las bacterias transformadas para poder utilizarlas en los experimentos de transformación con *Agrobacterium*

### **Anexo 3.2: Protocolo de transformación genética por el método biolístico.**

#### Consideraciones previas al experimento

1. Para los experimentos de transformación por biolística se utilizaron suspensiones celulares de distintos cultivares. Una semana antes de los experimentos, se han de filtrar las suspensiones celulares para conseguir que haya únicamente pequeños agregados y llevar el volumen final de la suspensión a un volumen de 60 o de 120 mL dependiendo el tamaño del experimento.
2. Además se han de preparar los medios de cultivo necesarios para el experimento de transformación. Estos medios son GM+NOA, PAGAR, MS/2OSRED 10 y 20 y MS/2CA (ver Anexo 1.2) con antibióticos (según el gen de resistencia en el plásmido) en cantidad suficiente para todos los tratamientos.
3. Se deben tener listas también las alícuotas de partículas estériles. Para ello se pesan 30 mg de las partículas y se introducen en un vial de cristal. Este vial se coloca en una estufa a  $180^\circ\text{C}$  durante 12 horas. Pasado ese tiempo se saca y se deja enfriar en una cabina de flujo laminar. Cuando haya enfriado se añade al vial  $0.5 \text{ mL}$  de isopropanol y se agita en un agitador vigorosamente durante 2 minutos. Después se deja actuar el isopropanol durante 15 minutos para descontaminar las partículas. Posteriormente, se agita de nuevo el vial y se coloca en un tubo Eppendorf de  $1.5 \text{ mL}$ . Este tubo se centrifuga a una velocidad de  $13000 \text{ g}$  durante 1 minuto. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante con una pipeta, se descarta y se añade  $0.5 \text{ mL}$  de agua MilliQ estéril y se resuspenden las partículas con el agitador durante 30 segundos. Después se centrifuga como antes durante 1 minuto, se elimina el sobrenadante y se repite el lavado (se ha de repetir el lavado con agua 3 veces). Por último, se resuspenden las partículas en  $0.5 \text{ mL}$  de 50% (v/v) de glicerol/agua MilliQ estéril, se agita vigorosamente durante 1 min y ya se puede dividir en alícuotas de  $50 \mu\text{L}$ . Estas alícuotas se guardan a  $4^\circ\text{C}$  durante un máximo de 1 mes.

4. Para el la adherencia del ADN a la partícula es necesario tener preparadas soluciones de  $\text{CaCl}_2$  2,5 M, Espermidina 0,1 M y el ADN a una concentración de  $1 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ .

#### Preparación del experimento

##### 1. Preparación de la cabina de flujo laminar

En primer lugar, se ha preparar la cabina de flujo laminar para dispensar las suspensiones celulares. Para ello introducimos los elementos del kit de transformación preparados y autoclavados con anterioridad (Figura A3-2 A):

##### Kit de Transformación Genética.

Matraz Erlenmeyer de 500 mL con imán agitador.

Embudo con filtro.

Embudo Büchner.

Matraz Kitasato de 500 mL.

Placa con filtros de papel Whatman nº2 (entre 35-40).

Tubo de centrifuga de vidrio con matraz Erlenmeyer de 100 mL.

Botella con tapón de 100 mL.

Matraz Erlenmeyer de 250 mL.

Se debe envolver todo en papel de aluminio con doble capa.

Además, pondremos pipetas Pasteur estériles de 10 y 25 mL, una propipeta automática, pinzas estériles y un esterilizador de pinzas. También hay que introducir en la cabina de flujo el medio de cultivo PAGAR. Se necesita también una bomba de vacío que irá unida al matraz Kitasato.



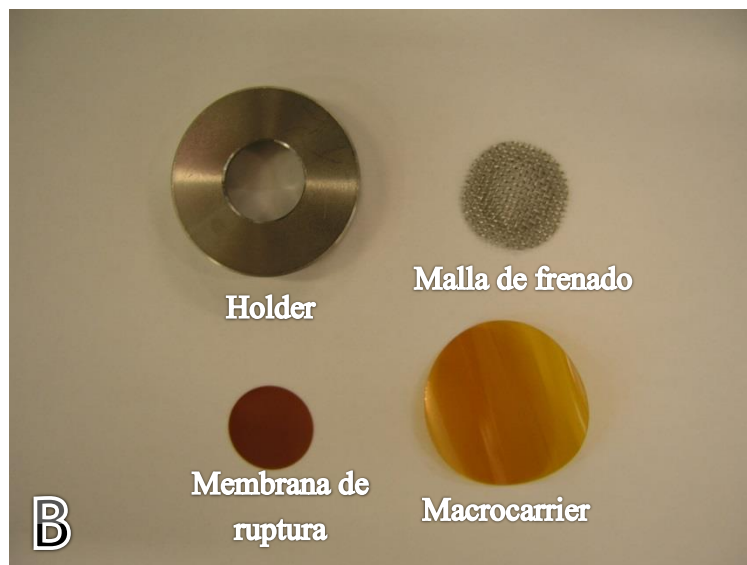


Figura A3-2: A: Material para el dispensado de las células preparado en la cabina de flujo laminar. B: Elementos del aparato para la transformación por biolística. C: Aparato PDS-1000/He de Biolistic (Bio-Rad) y sus piezas.

## 2. Dispensación de la suspensión celular.

Con todo preparado se ha de dispensar la suspensión celular en el medio de cultivo PAGAR para utilizarlas posteriormente en el experimento de transformación. Se coloca el matraz de suspensión celular en la cabina de flujo; se coloca el embudo con el filtro en el matraz con el imán colocado en un agitador y se filtra la suspensión celular (vertiéndola en espiral para no saturar el filtro). Se agita a una baja velocidad para no dañar a las células y se va añadiendo volumen de medio GM+NOA hasta obtener la suspensión celular con un volumen suficiente para tener 5 mL de suspensión celular a PCV (*packed cell volume*) de 0,2 mL por placa como mínimo. Para medir el PCV se utilizan 10 mL de suspensión en un

tubo de centrifuga que se deja decantar (se van haciendo medidas hasta alcanzar la concentración de 0,2 mL).

Una vez obtenido el volumen que queremos para dispensar y al PCV adecuado, se procede de esta manera:

- Se coloca un filtro Whatman estéril en el embudo Büchner y se le ponen unas gotas de agua MiliQ estéril.
- Se enciende la bomba de vacío, prestando atención a que el papel se quede pegado al fondo del embudo.
- Con la pipeta automática y una pipeta de 10 mL y con la suspensión celular en agitación constante, se cogen 5 mL de la suspensión y se dispensa sobre el papel de filtro en espiral (para intentar formar una fina capa de células sobre todo el papel).
- Después se apaga la bomba de vacío y con las pinzas se recoge el papel con las células y este se coloca sobre el medio PAGAR.
- Repetir hasta terminar con las placas necesarias (6 por tratamiento + 6 de la prueba GUS).
- Al acabar con las placas, se preparan las placas de control de regeneración con 5 mL y 1 mL de suspensión celular.
- Además, en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se pone 1mL de suspensión para realizar una prueba de viabilidad de las células mediante el test del trifetil tetrazolio.
- Se mantiene en oscuridad (en nuestro caso las torres de placas se taparon con papel de aluminio) durante 2 horas para que el material pierda agua (se plasmolice) por el medio y al bombardear con las partículas no rompa la célula.

### 3. Adherencia del ADN a las partículas.

Mientras transcurren las 2 horas, se procede a realizar la adherencia de las partículas. Para ello se utilizan las alícuotas de partículas que se habían preparado anteriormente. También es necesario el ADN, el  $\text{CaCl}_2$  y la Espermidina. También se tiene que tener preparados los *holders*, los *macrocarriers* (Figura A3-2 B), unas placas con silicagel junto a otras placas perforadas esterilizadas con alcohol 70% (de manera que las placas perforadas encajen en las del silicagel), isopropanol, papel estéril, unas pinzas estériles, micropipetas y puntas con filtro.

Se esterilizan los *holders* y los *macrocarriers* con alcohol al 70% durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, utilizando papel estéril sobre la cabina, se sacan del alcohol y se dejan secar sobre este durante 5 minutos.

Una vez secos se han de montar. Con la ayuda de unas pinzas, colocar el *macrocarrier* dentro del *holder* y colocar de 6 en 6 (cada placa de *holders* servirá para un tratamiento) en las placas perforadas con silicagel, tapar las placas y cerrarlas con Papel de parafina. Dejar 20 minutos.

A la vez que secan los *holders*, se puede empezar la adherencia del ADN a las partículas. Para ello se siguen estos pasos:

- Centrifugar brevemente el ADN.
- Centrifugar los tubos con las partículas a 13000 g durante 2 min.
- Retirar el sobrenadante, y añadir 50  $\mu\text{L}$  de *buffer* TE 1X (Tris-EDTA) a pH 8,5 esterilizado. Tras esto resuspender las partículas de oro con un agitador durante 2 minutos.
- Añadir a cada tubo por orden:

- 5  $\mu$ L de ADN. Agitar manualmente a continuación.
- 50  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  (añadirlo lentamente, gota a gota). Agitar.
- 30  $\mu$ L de Espermidina. Añadir primero 15, agitar, añadir los otros 15 y volver a agitar.
- Poner los tubos en un agitador térmico y agitar a 1500 rpm a 20 °C durante 7 minutos. Dejar reposar a los tubos durante otros 7 minutos.
- Centrifugar a 11000 g y retirar el sobrenadante.
- Añadir 140  $\mu$ L de etanol al 70% y resuspender las partículas.
- Centrifugar a 11000g y retirar el sobrenadante.
- Añadir 140  $\mu$ L de etanol al 100% y resuspender las partículas.
- Centrifugar a 11000g y retirar el sobrenadante.
- Añadir 50  $\mu$ L de etanol al 100% y resuspender las partículas.
- Dispensar 6  $\mu$ L de la suspensión de las partículas sobre los *macrocarriers*. Esto se debe hacer agitando un poco las partículas antes de cada vez para que sea homogéneo (lo que sobre se puede desechar o repartir entre los *macrocarriers*). También es recomendable dispensar en espiral para que sea homogéneo.
- Por último, volver a tapar los grupos de *holders* y dejar secar durante 20 minutos aproximadamente (este paso es crucial para eliminar la humedad que podría apelmazar las partículas).

#### 4. Bombardeo de las partículas sobre el material vegetal.

En nuestro caso, el aparato de biolística utilizado fue un PDS-1000/He de Biolistic (Bio-Rad). En primer lugar, se ha de limpiar y esterilizar y para ello utilizamos unos papeles Kimwipe estériles y rociamos con alcohol al 70% tanto por dentro como por fuera, además de las piezas internas de la máquina (piezas 1, 2, 3 y 4) (Figura A3-2C). Además, se han de esterilizar las membranas de ruptura (de 1100 psi) (Figura A3-2 B) con alcohol al 100%. Las mallas de frenado han tenido que ser esterilizadas previamente con autoclave.

Hay que establecer los parámetros de la máquina a 1300 psi (8963,2 kPa) de helio (200 psi por encima del nivel de ruptura de la membrana), 1 cm de distancia entre el disco de ruptura y el *macrocarrier*, 1 cm de distancia de vuelo del *macrocarrier*, 12 cm de distancia a las células diana y presión de vacío de 28 mmHg (94,8 kPa).

Una vez realizado todo esto, y siguiendo las instrucciones del fabricante se procede de esta manera:

- Se coloca la membrana de ruptura en la pieza correspondiente (pieza 1) y se atornilla en su lugar.
- Se coloca la malla de frenado en el agujero de la plataforma (pieza 2) para seguidamente colocar el *macrocarrier* hacia abajo (con cuidado de no golpearlo para que no caigan las partículas). Luego se han de atornillar las dos piezas (pieza 2 y 3). Se coloca la plataforma en el lugar correspondiente.
- En la parte inferior (pieza 4) se coloca una placa petri con la suspensión celular dispensada sin la tapa y se cierra la puerta de la máquina.
- Se activa la máquina PDS-1000/He y se aprieta el botón de vacío hasta llegar a 28 in. Hg y se mantiene. Entonces se aprieta el botón *fire* hasta que rompa la membrana de ruptura.
- Tras el bombardeo, se debe quitar el vacío. Después, coger la placa petri y taparla.
- Se quita de las piezas de la máquina el *holder*, el *macrocarrier*, la membrana de ruptura y la malla de frenado.



- Se repite con todas las placas.

Tras el bombardeo, todas las placas han de ponerse en oscuridad a  $23 \pm 1$  °C durante 1 día para permitir que las células perforadas se reparen y se integre el ADN.

#### 5. Tratamiento postbombardeo.

Al día siguiente del bombardeo (pasadas aproximadamente 16 horas) se transfiere todo el medio PAGAR con la suspensión celular (haciendo uso de la pestaña del papel de filtro que va con el medio) a placas con medio de cultivo OSRED 10 para que empiecen a recuperar de nuevo la turgencia las células paulativamente. Pasadas 9 horas se transfiere de nuevo todo el medio PAGAR a placas con el medio OSRED 20.

Dos días después del bombardeo y de que las células hayan pasado por los medios OSRED, se pueden transferir al medio de cultivo de selección. Utilizando unas pinzas, se coge un extremo del papel Whatman sobre los cuales están las células bombardeadas y con cuidado se transfiere el papel al medio MS/2CA con antibióticos. En este caso, solamente son necesarios los antibióticos de selección de planta, pues al no haber bacterias u otros plásmidos no son necesarios más agentes de selección. Se utiliza medio MS/2CA con los antibióticos kanamicina (a  $40 \text{ mgL}^{-1}$ ) y con higromicina ( $7,5 \text{ mgL}^{-1}$ ). Estas placas deben ser incubadas en oscuridad a 27°C para permitir la diferenciación y posterior germinación de los embriones. Este medio ha de ser renovado cada mes.

#### 6. Análisis de la expresión GUS.

En todos los experimentos de transformación se transforma, además de con el ADN que se quiere transferir a las plantas, con el plásmido PBI426, que contiene el gen *uidA* de la  $\beta$ -glucuronidasa. Esto es útil para poder analizar la expresión GUS de forma transitoria en forma de puntos azules, que nos dará indicios de cómo ha podido salir el experimento y hasta qué punto las células son competentes para la transformación, de manera que un experimento en el que la media de puntos sea alto ( $>2000$ ), será un experimento en donde las células vegetales estaban en buenas condiciones para la transformación y los pasos del protocolo han ido bien, mientras que uno que tenga un número de puntos bajo ( $<2000$ ), puede indicar que no ha ido todo bien y/o que las células no eran buenas para transformar (comunicación personal, Dr. Jose Ramón Vidal Juviño). Este ensayo es destructivo y el material testado no se puede recuperar (Walden y Schell, 1990).

Para ello, dos días después del bombardeo, se cogen las placas disparadas con el plásmido PBI426 y con unas pinzas se retira el papel de filtro para colocarlo en otra placa vacía. Después, se reparte por la superficie del filtro y sobre las células vegetales, 600  $\mu\text{L}$  de la solución X-gluc (5-Bromo-4-chloro-1*H*-indol-3-yl  $\beta$ -D-glucopyranosiduronic acid), que es un sustrato para la  $\beta$ -glucuronidasa, y que genera unos precipitados azules que dan lugar a los puntos azules (Anexo 1.1.6). Las placas selladas con papel de parafina se cultivan a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, los puntos azules aparecen si la transformación ha ocurrido. Estos se cuentan con una lupa binocular y un contador manual.

### Anexo 3.3: Protocolo de transformación genética mediada por *A. tumefaciens*.

Previo al experimento es necesario preparar el material vegetal, en este caso, los callos embriogénicos. Con entre 1 y 2 meses de antelación, hay que preparar medio C<sup>1</sup>P en placas de 55 mm y reproducir el callo en bastante cantidad, generalmente de 6 a 8 placas de callo para cada variedad (se consigue aproximadamente 3 gramos de callo en total), tras lo que se deja crecer 1 o 2 meses en oscuridad a 24 °C.

Para la amplificación del *A. tumefaciens* se preparan placas con medio LB sólido a pH 7,5 con los antibióticos kanamicina (50 mgL<sup>-1</sup>), rifampicina (25 mgL<sup>-1</sup>) y tetraciclina (10 mgL<sup>-1</sup>). Más tarde, se recoge una alícuota de los stocks de glicerol de las cepas de *Agrobacterium* con los plásmidos pGreen 179+VvFT y 179+Vvgai y se siembra en el medio de cultivo. Después se deja incubar durante 36 horas a 25 °C.

El siguiente paso es la puesta en contacto de las bacterias con el material vegetal. Para ello se prepara medio MS líquido con acetosiringona (100 µM) y posteriormente se ponen 10 mL de medio en tubos Falcon estériles (tantos como genotipos y cepas a transformar) y se resuspende *Agrobacterium* de las placas cultivadas en los tubos hasta que se obtenga una densidad óptica a 600 λ de entre 0,25 y 0,35. Además se prepara medio GS1CA sólido con la misma concentración de acetosiringona para el co-cultivo (3 por construcción y por genotipo). Más tarde se pesan los callos hasta obtener una cantidad aproximada de 1 g de callo por construcción, y tras eso, se coloca el callo en los 10 mL de suspensión bacteriana, se agita para disgregarlo, y se deja en contacto con ella durante 15 minutos. Mientras tanto, se prepara una placa petri de 90 mm estériles en la cabina y con la ayuda de unas pinzas esterilizadas, se coloca en la tapa 2 filtros Whatman n°2 y sobre la placa se coloca una malla de fibra de nailon también estéril para una vez pasados los 15 minutos, se vierte la suspensión bacteriana con el callo sobre la malla de nailon para filtrarlo. Después se coloca sobre la tapa con el papel para que absorba parte de lo que quede del líquido. Con la espátula, se recupera el callo y se dispone en pequeños agregados en las placas de medio GS1CA sólido con la acetosiringona y se deja 2 días a 25 °C en condiciones de oscuridad (cocultivo).

Pasados esos dos días, se realiza el lavado de la bacteria. Para este paso, se prepara en la cabina de flujo laminar unos tubos Falcon con 10 mL de medio MS líquido a pH 6,5 (tantos como tratamientos). De igual manera se preparan otros tubos Falcon con el mismo medio de cultivo anterior (10 mL) con los antibióticos cefotaxima (a 500 mgL<sup>-1</sup>) y Augmentine (amoxicilina y ácido clavulánico en una proporción 875:125) (a 500 mgL<sup>-1</sup>). También es necesario medio GS1CA sólido con los antibióticos cefotaxima (200 mgL<sup>-1</sup>) y Augmentine (200 mgL<sup>-1</sup>) en placas de 55 mm (de manera que se puede repartir el callo y si hay sobrecrecimiento de *Agrobacterium* se puede eliminar la placa sin eliminar demasiado callo) en cantidad de 5 o 6 placas por tratamiento. Para lavar la bacteria se recogen los callos y utilizando una espátula se meten en los tubos con el medio MS líquido sin antibióticos y se agita bien. Se deja decantar y con unas placas con filtros de nailon y papeles Whatman (como se utilizó en el paso anterior) se filtra la suspensión en la malla de nailon, quedándose con el callo y se vuelve a poner en el tubo Falcon. Este paso se repite una segunda vez. Entonces se coloca la malla encima de los filtros para escurrir y se cambian la placa y el filtro de nailon. El siguiente paso es lavar la bacteria como en el paso anterior, pero utilizando el medio MS con los antibióticos. Se repite una segunda vez. Se deja escurrir junto con los papeles Whatman y se recoge el callo, colocándolos en montones pequeños de aproximadamente 0,5 cm en las placas de medio sólido GS1CA con antibióticos. Las placas se mantienen en oscuridad a 25 °C durante 2 semanas.



Para la selección de las bacterias después de las 2 semanas, se necesita medio en placas de 55 mm de GS1CA sólido con cefotaxima (200 mgL<sup>-1</sup>), Augmentine (200 mgL<sup>-1</sup>) y el antibiótico de selección higromicina (12,5 mgL<sup>-1</sup>). Los callos se pasan al medio nuevo y se dejan en las mismas condiciones durante un mes aproximadamente. Pasado ese mes, se renueva el medio de cultivo (se ha de repetir 2 veces). Es posible que dependiendo de la línea y el tamaño de los callos se deba poner más o menos concentración de antibiótico de selección de las plantas transformantes. Esto se hace observando el desarrollo durante los meses y dependiendo de cómo evolucione el cultivo se aumenta o disminuye el antibiótico.

Pasados esos meses, se pasan los callos a MS/2 sólido con cefotaxima (200 mgL<sup>-1</sup>), Augmentine (200 mgL<sup>-1</sup>) e higromicina (2,5 mgL<sup>-1</sup>) en placas de 90 mm y se transfieren los callos con el fin de permitir que germinen los embriones. El medio se renueva cada mes durante 3 meses. Durante esos tres meses se van recuperando los embriones que vayan apareciendo y separándolos en frascos pequeños con el mismo medio de cultivo. Cuando vayan apareciendo las primeras hojas verdaderas, los embriones se van aislando en medio de cultivo MS/2 sin antibióticos para permitir que la planta se desarrolle con normalidad.

**Anexo 4:** Porcentaje de embriogénesis de cada uno de los tratamientos con el cultivar, procedencia, medio, órgano, estadio, número de explante totales, número de eplantes muertos, número de explantes con callo, número de callos embriogénicos y porcentaje de embriogénesis de los cultivares ‘Albariño’ y ‘Tempranillo’.

Cultivar	Procedencia	Medio	Órgano	Estadio	nº placas	nº explantes	Explantes muertos	Callos	Embriogénicos	%Embriogénesis
Albariño	Germinador	MSE	A	II	9	450	367	113	11	2,44
Albariño	Germinador	MSE	A	III	8	400	278	122	7	1,75
Albariño	Germinador	MSE	A	IV	9	450	290	160	32	7,11
Albariño	Germinador	NNE	A	II	8	400	279	121	28	7,00
Albariño	Germinador	NNE	A	III	9	450	349	101	13	2,89
Albariño	Germinador	NNE	A	IV	5	250	142	108	13	5,20
Albariño	Germinador	MSE	O	II	7	140	0	140	8	5,71
Albariño	Germinador	MSE	O	III	8	160	0	160	43	26,88
Albariño	Germinador	MSE	O	IV	7	140	0	140	24	17,14
Albariño	Germinador	NNE	O	II	8	160	0	160	13	8,13
Albariño	Germinador	NNE	O	III	9	180	0	180	18	10,00
Albariño	Germinador	NNE	O	IV	8	160	0	160	9	5,63
Albariño	Campo	MSE	A	II	4	200	146	54	2	1,00
Albariño	Campo	MSE	A	III	4	200	99	101	10	5,00
Albariño	Campo	MSE	A	IV	4	200	73	127	13	6,50
Albariño	Campo	NNE	A	II	4	200	186	14	3	1,50
Albariño	Campo	NNE	A	III	4	200	169	31	12	6,00
Albariño	Campo	NNE	A	IV	4	200	160	40	9	4,50
Albariño	Campo	MSE	O	II	4	80	0	80	1	1,25
Albariño	Campo	MSE	O	III	4	80	0	80	8	10,00
Albariño	Campo	MSE	O	IV	4	80	0	80	4	5,00
Albariño	Campo	NNE	O	II	4	80	8	72	0	0,00
Albariño	Campo	NNE	O	III	4	80	0	80	2	2,50
Albariño	Campo	NNE	O	IV	4	80	0	80	5	6,25
Tempranillo	Germinador	MSE	A	II	9	450	425	25	2	0,44
Tempranillo	Germinador	MSE	A	III	8	400	261	139	2	0,50

Tempranillo	Germinador	MSE	A	IV	4	200	183	17	0	0,00
Tempranillo	Germinador	NNE	A	II	8	400	350	50	0	0,00
Tempranillo	Germinador	NNE	A	III	9	450	253	197	0	0,00
Tempranillo	Germinador	NNE	A	IV	4	200	106	94	1	0,50
Tempranillo	Germinador	MSE	O	II	8	160	20	140	9	5,63
Tempranillo	Germinador	MSE	O	III	8	160	62	98	13	8,13
Tempranillo	Germinador	MSE	O	IV	4	80	2	78	6	7,50
Tempranillo	Germinador	NNE	O	II	8	160	36	124	7	4,38
Tempranillo	Germinador	NNE	O	III	8	160	0	160	6	3,75
Tempranillo	Germinador	NNE	O	IV	4	80	0	80	3	3,75
Tempranillo	Campo	MSE	A	II	4	200	188	12	0	0,00
Tempranillo	Campo	MSE	A	III	4	200	122	78	0	0,00
Tempranillo	Campo	MSE	A	IV	4	200	75	125	0	0,00
Tempranillo	Campo	NNE	A	II	4	200	183	17	0	0,00
Tempranillo	Campo	NNE	A	III	4	200	83	117	0	0,00
Tempranillo	Campo	NNE	A	IV	4	200	118	82	0	0,00
Tempranillo	Campo	MSE	O	II	4	80	40	40	1	1,25
Tempranillo	Campo	MSE	O	III	4	80	0	80	0	0,00
Tempranillo	Campo	MSE	O	IV	4	80	0	80	0	0,00
Tempranillo	Campo	NNE	O	II	4	80	45	35	3	3,75
Tempranillo	Campo	NNE	O	III	4	80	8	72	0	0,00
Tempranillo	Campo	NNE	O	IV	4	80	12	68	0	0,00

**Anexo 5:** Media y error de embriones emergidos en medio con antibióticos de diferentes líneas de los cultivares ‘Albariño’ y ‘Tempranillo’.

Kanamicina (mgL <sup>-1</sup> )										
Línea	0	10	20	30	40	50	60	70	80	
Albariño 6	99±17	112±23	110±27	10±0,9	0,3±0,3	0±0	0±0	0±0	0±0	
Albariño 10	94±12	60±12	53±15	6±3,2	0,2±0,2	0±0	0±0	0±0	Nt	
Albariño 14	81±16	61±19	21±10	6±2,1	0,2±0,2	0±0	0±0	0±0	Nt	
Albariño 25	256±38	189±40	61±12	6±2	4,8±2,4	0±0	0±0	0±0	Nt	
Albariño 26	169±47	80±18	56±2,5	11±5	0±0	0±0	Nt	Nt	Nt	
Tempranillo 1	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	231±17,3	245±26,6	236±24,3	171±9,3	Nt	
Tempranillo 14	103±31,4	16±1,2	9±1,6	7±0,5	6±0,7	3±1,2	3±0,5	1±0,6	2±0,6	
Tempranillo 17	50±12	58±13	23±5,2	22±6,7	17±2	11±2,1	8±1,2	5±2	0±0	
Higromicina (mgL <sup>-1</sup> )										
Línea	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	
Albariño 5	110±50	122±38	103±12	20±2,5	4,4±1,3	0±0	0±0	0±0	0±0	
Albariño 25	315±53	283±60	60±11	1±0,4	0±0	0±0	0±0	0±0	Nt	
Albariño 26	154±25	216±31	109±13	11±1,5	8,2±2	0±0	0±0	0±0	Nt	
Tempranillo 1	813±40	365±26	22±3	5±0,33	3±1,5	1±1	0±0	0±0	0±0	

**Anexo 6:** Comparativas de las secuencias del gen *Vvgai* (accesión NCBI AF378125) con el gen *Vvgai* clonado en los plásmidos pGreen. El porcentaje de similitud está alrededor del 97% (contando los fallos generados por el secuenciador). El cuadrado azul corresponde con la mutación *Vvgai*.

Query	167	CCCACCGGCAAGGGTAAGATGTGGGATGCCGACCCCAAGACGCCGGCATGGATGAG	226
Sbjct	11	CCCACCGGC-A-GGT-RGATGTGGGATGCCGACCCCAAGACGCTGGCATGGATGAG	67
Query	227	CTTCTCGCTGTTTTGGGCTACAACGTCAGGCCTCCGACATGGCTGAGGTCGCTCAGAAG	286
Sbjct	68	CTTCTCGCTGTTTTGGGCTACAACGTCAGGCCTCCGMCATGGCTGAGGTCGCTCAGAAG	127
Query	287	CTTGAACAGCTTGAGGAAGTTATTGTTAATGCTCAGGAGGATGGCCTCTCTCAT-CTCGC	345
Sbjct	128	CTTGAACAGCTTGAGGAAGTTATTGTTAATGCTCAGGAGGATGGCCTCTCTCATYCTCKY	187
Query	346	TTCCGAGACTGTTCAATTACAACCCCTCCGATCTGTCTAACTGGCTTGAAGCATGCTCTC	405
Sbjct	188	TTCCGAGACTGTTCAATTACAACCCCTCCGATCTGTCTAACTGGCTTGAAGCATGCTCTC	247
Query	406	CGAGTTCAACCCCACTCCCAATTGCGCCCTTGACAACCCATTCTTGCCCTCCCATCTCCCC	465
Sbjct	248	CGAGTTCAACCCCACTCCCAATTGCGCCCTTGACAACCCATTCTTGCCCTCCCATCTCCCC	307
Query	466	TCITGATTACACCAATTGCAGCACCCAACCAAAACAGGAGCCTTCCATCTTTGACTCCCC	525
Sbjct	308	TCITGATTACACCAATTGCAGCACCCAACCAAAACAGGAGCCTTCCATCTTTGACTCCCC	367
Query	526	GTCTTTGGATTACGATCTCAAAGCAATTCAGGTAAGGCTCTTTATCCCATATCGAACA	585
Sbjct	368	GTCTTTGGATTACGATCTCAAAGCAATTCAGGTAAGGCTCTTTATCCCATATYKWAYA	427
Query	586	GCCGCCGCAACAGCCACCGGCCCCCTCTCTATCAAAGGGATAACAAGCGATTGAAGCC	645
Sbjct	428	GCCGCCGCAACAGCCACCGGCCCCCTCTCTATCAAAGGGATAACAAGCGATTGAAGCC	487
Query	646	CACGACTTCAGCTACAGCCAACCTCGGTTTCCTCTGTTATTGGGGGTTGGGGAGITCCAC	705
Sbjct	488	CACGACTTCAGCTACAGCCAACCTCGGTTTCCTCTGTTATTGGGGGTTGGGGAGITCCAC	547
Query	706	CGAGTCCGCTCGCCAGTTGTCTTGTGACTCGCAAGAGACCGGAATCAGGCTAGTCCA	765
Sbjct	548	CGAGTCCGCTCGCCAGTTGTCTTGTGACTCGCAAGAGACCGGAATCAGGCTAGTCCA	607
Query	766	CACCCTAATGGCCTGTGAGAAGCGGTCCAGCAGGAAAACTGAAGCTGGCTGAAGCACT	825
Sbjct	608	CACCCTAATGGCCTGTGAGAAGCGGTCCAGCAGGAAAACTGAAGCTGGCTGAAGCACT	667
Query	826	TGTCAAGCAAATCGGGTTCCTGGCCGTGTCTCAGGCGGGAGCCATGCGGAAGGTAGCCAC	885
Sbjct	668	TGTCAAGCAAATCGGGTTCCTGGCCGTGTCTCA-GCGGGAGCCATGCGGAAGGTAGCCAC	726
Query	886	CTACTTCGCCGAAGGTCTAGCTCGTCGAATCTACCGACTCTATCCTGATAAGCCTCTCGA	945
Sbjct	727	CTACTTCGCCGAA-GTCTAGCTCGTCGAATCTACCGACTCTATCCTGATAAGCCTCTCGA	785

